

Institut für Neurale Signalverarbeitung
Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg
Prof. Dr. rer. nat. Olaf Pongs
Falkenried 94, 20251 Hamburg

**Modulation von Kv4.2-Kanälen durch ein
Peptidtoxin isoliert aus dem Gift der
Vogelspinne *Theraphosa leblondi***

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Medizin
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jan Ebbinghaus

Hamburg 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Membranpotentiale und assoziierte Leitfähigkeiten.....	5
1.2	Ionenkanäle und Kanalmodulatoren.....	6
1.3	Spannungsaktivierte Kaliumkanäle.....	8
1.4	Peptidtoxine.....	11
1.5	Arbeitshypothese und Fragestellung.....	13
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Molekularbiologie.....	15
2.1.1	Lösungen und Medien.....	15
2.1.2	Verwendete Klone.....	15
2.1.3	Re-Transformation kompetenter Zellen.....	16
2.1.4	Plasmid-Isolierung.....	17
2.2	Zellkultur.....	17
2.2.1	Lösungen und Medien.....	17
2.2.2	Routinehaltung.....	18
2.2.3	Transfektion.....	19
2.2.3.1	Die Calciumphosphat-Kopräzipitations-Methode	
2.2.3.2	Die Liposomen-Einschluss-Methode	
2.3	Neurone.....	21
2.4	Gift und Toxine.....	22
2.4.1	Die Spinnen.....	22
2.4.2	Toxinisolation aus dem Gift.....	22
2.4.3	Toxinapplikation.....	25
2.5	Elektrophysiologie.....	26
2.5.1	Elektrolytlösungen.....	26
2.5.2	Versuchsaufbau.....	27
2.5.3	Die Patch-Clamp Technik.....	29
2.5.4	Durchführung der Patch-Clamp Messung.....	30
2.5.5	Kapazitäten, Serienwiderstand, Leckstrom.....	32

2.5.6	Aufzeichnung und Auswertung der Daten.....	34
	(Theoretische Grundlagen)	
2.5.6.1	Das Gleichgewichtspotential	
2.5.6.2	Leitfähigkeit-Spannungs-Beziehung	
2.5.6.3	Dosis-Wirkungs-Beziehung	
2.5.6.4	Zeitkonstanten der Inaktivierung und Deaktivierung	
3	Ergebnisse.....	38
3.1	<i>Theraphosa leblondi</i> – Gift (Venom).....	38
3.1.1	Inhibierung der A-Typ-Stromkomponente in Neuronen..	38
3.1.2	Selektive Inhibierung von Kv4-Strömen.....	41
3.1.3	Veränderung der Inaktivierungskinetik von.....	42
	Kv4.2-Kanälen durch Venom	
3.1.4	Wirkung von Venom auf die Aktivierung von.....	44
	Kv4.2-Kanälen	
3.2	<i>Theraphosa leblondi</i> - Toxin 1 (TITx1).....	47
3.2.1	Dosisabhängige Inhibierung von Kv4.2-Strömen.....	47
	durch TITx1	
3.2.2	Veränderung der Inaktivierungskinetik von.....	49
	Kv4.2-Kanälen durch TITx1	
3.2.3	Wirkung von TITx1 auf die Aktivierung von.....	50
	Kv4.2-Kanälen	
3.2.4	Wirkung von TITx1 auf die Deaktivierungskinetik.....	53
	von Kv4.2-Kanälen	
3.2.5	Inhibierung von Kv2.1(4.2 S3-S4)-Strömen.....	55
	durch TITx1	
4	Diskussion.....	57
4.1	Bindungsstelle für TITx1 auf dem Kv4.2-Kanal.....	57
4.2	TITx1 verändert das Gating des Kv4.2-Kanals.....	60
4.3	Anwendungsmöglichkeiten für TITx1.....	62
5	Zusammenfassung.....	65

6	Literaturverzeichnis.....	66
7	Anhang.....	78
7.1	Abkürzungen.....	78
7.2	Lebenslauf.....	80
7.3	Danksagung.....	81
7.4	Eidesstattliche Versicherung.....	82

1 Einleitung

1.1 Membranpotentiale und assoziierte Leitfähigkeiten

An vielen Zellmembranen entstehen elektrische Impulse, welche in Form von Aktionspotentialen fortgeleitet werden und der Signalübermittlung dienen (Hille 2001).

Die ionale Grundlage der Entstehung von Signalen wurde von Hodgkin und Huxley vor mehr als 50 Jahren aufgeklärt. Durch damals an den Axonen von Nervenzellen eines Riesentintenfisches durchgeführte Versuche gelangten sie zu der Schlussfolgerung, dass ein Aktionspotential durch spannungsabhängige Änderungen der Membranleitfähigkeiten für Natrium- (Na^+) und Kalium-Ionen (K^+) entsteht (Hodgkin und Huxley 1952). In der einfachsten von Hodgkin und Huxley beschriebenen Form besteht das Aktionspotential aus einem kurzen Einstrom von Na^+ , was zu einer Depolarisierung der Zellmembran führt, und einer erhöhten Durchlässigkeit der Membran für K^+ , welche durch einen Ausstrom von K^+ für die Wiederherstellung des Membranruhepotentials verantwortlich ist. Eine hohe Leitfähigkeit der Zellmembran für K^+ unter Ruhebedingungen ist außerdem für die Erhaltung des Ruhepotentials verantwortlich. Neben spannungsabhängigen Erhöhungen der Leitfähigkeiten für Na^+ und K^+ spielen auch spannungsaktivierte Calciumleitfähigkeiten eine wichtige Rolle. Diese können zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen, was in bestimmten Zellen die Ausschüttung eines Transmitters oder Hormons bewirken kann. Wenn an einer Synapse ein Transmitter ausgeschüttet wird, kann dadurch in der postsynaptisch gelegenen Zelle entweder ein exzitatorisches Potential (EPSP) durch Einstrom von Na^+ (oder Ca^{2+}) oder ein inhibitorisches Potential (IPSP) durch Einstrom von Chlorid (Cl^-) entstehen (Silbernagel 1991).

1.2 Ionenkanäle und Kanalmodulatoren

Die Zellmembran als Lipiddoppelschicht mit ihrem hydrophoben Charakter wirkt als Barriere zwischen Intra- und Extrazellulärraum und ist für Ionen nur schlecht passierbar. Dies ist für die Aufrechterhaltung der Unterschiede in der Ionenzusammensetzung zwischen Intra- und Extrazellulärraum nötig. Für den schnellen Durchtritt von Ionen, wie etwa Na^+ oder K^+ beim Aktionspotential, enthält die Zellmembran eine besondere Familie von membrandurchspannenden Proteinen, die Ionenkanäle. Diese können sehr spezifisch bestimmte Ionen durch die Membran leiten.

Eine Öffnung dieser Membrankanäle kann durch verschiedene Reize bewirkt werden: Chemisch (liganden- oder transmittergesteuerte Ionenkanäle), mechanisch durch Druck oder Dehnung oder, wie im Falle der am Aktionspotential beteiligten Kationenkanäle, durch eine Änderung des Membranpotentials (spannungsaktivierte Ionenkanäle) (Hille 2001).

Eine Möglichkeit in elektrophysiologischen Messungen die verschiedenen Komponenten nativer Ionenströme bzw. die ihnen zugrundeliegenden Ionenkanäle voneinander zu unterscheiden, ist die Verwendung von Antagonisten und Agonisten, welche selektiv an bestimmte Populationen von Ionenkanälen binden und diese blockieren bzw. aktivieren. Das aus dem japanischen Kugelfisch stammende Tetrodotoxin (TTX) hat sich z.B. als sehr wirksamer und nützlicher, da selektiver, Blocker von spannungsgesteuerten Natriumkanälen erwiesen (Narahashi, Moore et al. 1964).

In der Ionenkanalforschung sind Antagonisten und Agonisten, die spezifisch an Ionenkanäle binden, von großer Hilfe. Ein Verwendungsbereich liegt in der Aufklärung der physiologischen Rolle bestimmter klonierter Kanalproteine. So ist die molekulare Zusammensetzung von Kanälen *in vivo* und deren physiologische Rolle bei der Funktion von Zellen oft noch weitgehend ungeklärt. Ein anderer Verwendungsbereich ist die Aufklärung der räumlichen Struktur von Kanälen nach dem Prinzip eines Negativabdruckes der Bindungsstelle. Einige Substanzen haben sich als wertvolle Hilfsmittel beim Verständnis der genauen Mechanismen beim Übergang der Kanäle in

verschiedene Zustände wie geöffnet oder geschlossen, dem sogenannten „Gating“ von Kanälen, erwiesen.

Die selektive Beeinflussung von Ionenkanälen ist auch bei der Suche nach neuen Arzneistoffen von großer Bedeutung. Es gibt viele Beispiele für Giftstoffe aus der Natur bzw. Substanzen, welche an Ionenkanäle binden, die Eingang in den medizinischen Alltag gefunden haben: Curare-Abkömmlinge wie d-Tubocurarin und deren muskelrelaxierende Wirkung durch Blockade postsynaptischer Acetylcholinrezeptoren (Bertrand, Bertrand et al. 1992; Lüllmann 1999), die lokalanästhetische Wirkung von Lidocain durch Blockierung von Na⁺-Kanälen (Weidmann und Petersen 1955; Hille 1966), die antiarrhythmische Wirkung von Amiodaron am Herzen durch Blockade von bestimmten K⁺-Kanälen (Rolf, Haverkamp et al. 2000) oder die Wirkung von organischen Ca²⁺-Kanal-Blockern (Dihydropyridine) auf das Herz-Kreislauf-System (Fleckenstein 1985; Valmier, Richard et al. 1991; Hockerman, Peterson et al. 1997).

Besonders aus der Gruppe der Kaliumkanäle gibt es eine ganze Reihe an weiteren vorstellbaren therapeutischen Zielen. Ein bestimmter Kaliumkanal (Kv1.3), welcher in der Lymphocytenmembran vorkommt, spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Lymphocyten (Miller 2000). Eine selektive Hemmung dieses Kanals stellt ein potentiell Ziel für die Entwicklung neuer, immunsuppressiver Medikamente dar (Matko 2003; Wulff, Beeton et al. 2003). Inhibitoren des Kaliumkanals Kv1.5 sind potentielle antiarrhythmische Agentien (Van Wagoner, Pond et al. 1997) und Inhibitoren des Kv1.7-Kanals könnten als Antidiabetika die Insulinfreisetzung im Pankreas erhöhen (Kalman, Nguyen et al. 1998).

Es sind bereits viele Stoffe mit einer Wirkung auf Ionenkanäle wie Nikotin (Wang, Shi et al. 2000), Metallionen wie Mg²⁺ oder Zn²⁺ (Talukder und Harrison 1995), Tetraethylammonium (TEA) (Tasaki und Hagiwar 1957) oder 4-Aminopyridin (4-AP) (Pelhate, Hue et al. 1974; Pelhate und Pichon 1974) bekannt.

Ihre Wirkung ist jedoch meist nicht spezifisch für einen bestimmten Ionenkanal bzw. für bestimmte Subtypen von Ionenkanälen.

Aus den Giften von Tieren und Pflanzen gewonnene Toxine haben im Gegensatz zu vielen anderen an Ionenkanäle bindenden Agentien oft eine besonders hohe Affinität für einen bestimmten Ionenkanal oder eine bestimmte Gruppe von Ionenkanälen. Aus der Grundlagenforschung sind bereits eine ganze Reihe von aus giftigen Organismen isolierte Toxine bekannt. Eine große Gruppe bilden Peptide bestehend aus 25 bis 65 Aminosäuren mit 3 bis 4 Disulfidbrücken, die eine Wirkung auf spannungsaktivierte („voltage-dependent“) Kaliumkanäle (Kv-Kanäle) zeigen (Pongs 2000).

1.3 Spannungsaktivierte Kaliumkanäle

Kaliumkanäle bilden die größte und vielfältigste Gruppe der Ionenkanäle mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Eigenschaften. Die erste klonierte Kaliumkanaluntereinheit stammte vom Shaker-Genlocus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Kamb, Iverson et al. 1987; Pongs, Kecskemethy et al. 1988; Timpe, Schwarz et al. 1988). Die Suche nach homologen cDNA-Sequenzen in *Drosophila* und Vertebraten erbrachte den Nachweis dreier weiterer spannungsabhängiger Kaliumkanal-Familien, so dass sich vier Subfamilien unterscheiden ließen: Shaker, Shab, Shaw und Shal in *Drosophila* und die entsprechenden Subfamilien Kv1 bis Kv4 (Chandy 1991; Chandy und Gutman 1993).

Zu den wichtigsten heute bekannten Kaliumkanälen zählen neben den bereits erwähnten spannungsabhängigen auswärtsgerichtenden Kaliumkanälen (Dubinsky und Oxford 1984), einwärtsgerichtende Kaliumkanäle (K_{ir}) (Bauer, Meyerhof et al. 1990; Reimann und Ashcroft 1999) und Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle (Lang und Ritchie 1987; Sah 1996).

Strukturell setzen sich die Shaker-verwandten Kv-Kanäle aus vier α -Untereinheiten zusammen (MacKinnon 1991). Es kann dabei zur Zusammenlagerung von vier gleichen, aber auch von unterschiedlichen Untereinheiten kommen (Isacoff, Jan et al. 1990). Die Bildung von

Heteromultimeren beschränkt sich jedoch in der Regel auf Mitglieder der gleichen Kv-Subfamilie (Covarrubias, Wei et al. 1991). Jede dieser Untereinheiten besteht aus sechs hydrophoben, α -helikalen Domänen, den Segmenten 1 - 6 (S1-S6) (Tempel, Papazian et al. 1987; Yellen 1998; Li-Smerin, Hackos et al. 2000). Am Aminoterminus, welcher genau wie der Carboxyterminus intrazellulär gelegen ist, befindet sich die T-Domäne. Diese spielt für die spezifische Zusammenlagerung der α -Untereinheiten und die Assoziation von modulierenden β -Untereinheiten eine wichtige Rolle (Li, Jan et al. 1992; Shen und Pfaffinger 1995; Sewing, Roeper et al. 1996; Yu, Xu et al. 1996). Zwischen S5 und S6 ist die sogenannte P-Domäne lokalisiert. Die vier zusammengelagerten P-Domänen der Untereinheiten bilden gemeinsam den größten Teil der Pore des Kanals (Hartmann, Kirsch et al. 1991; Yool und Schwarz 1991). Im Segment 4 (S4) wurde eine hohe Anzahl an positiv geladenen Aminosäureresten festgestellt. Dies führte zu der Vermutung, dass sich dort ein Spannungssensor befindet, welcher bei Änderungen der Membranspannung eine Konformationsänderung hervorruft und so das Öffnen und Schließen des Kanals steuert (Papazian, Timpe et al. 1991; Durell und Guy 1992; Larsson, Baker et al. 1996).

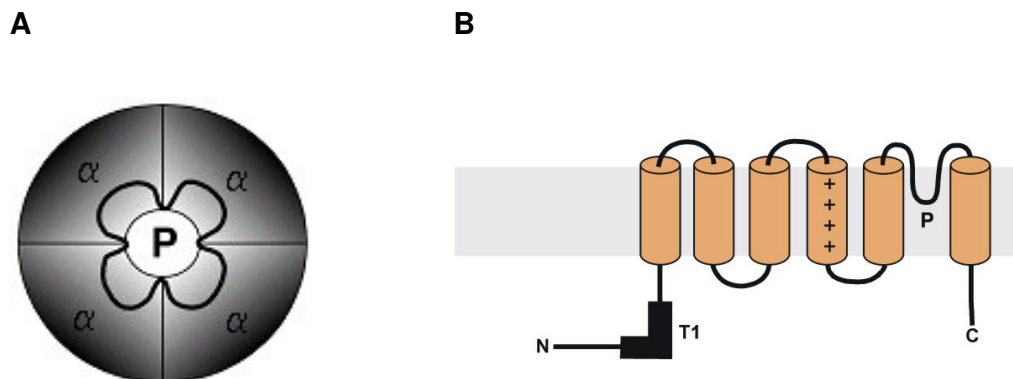


Abb. 1:

Schematische Darstellung der molekularen Struktur der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle (Kv) (A) Kv-Kanäle sind Tetramere aus vier α -Untereinheiten (α), die eine zentrale Pore (P) umschließen. (B) Die α -Untereinheiten der Kv-Kanäle bestehen aus sechs in der Zellmembran gelegenen α -helikalen Domänen, einer Porenregion (P), dem intrazellulär gelegenen C-Terminus (C) und dem ebenfalls intrazellulär gelegenen N-Terminus (N) mit der T-Domäne (T1).

Konformationsänderungen des Kanals, die den Durchtritt von Ionen ermöglichen oder verhindern, werden als „Gating“ bezeichnet. Nach dem Öffnen können Kanäle während Repolarisation der Zellmembran direkt wieder in einen geschlossenen Zustand übergehen (deaktivieren) oder in einen inaktivierten, refraktären Zustand übergehen (Hille 2001). Bei einigen Kanälen, wie z.B. den Kv4-Kanälen, spielt außerdem der direkte Übergang von einem geschlossenen Zustand in einen inaktivierten Zustand eine wichtige Rolle (Bähring, Boland et al. 2001).

Die in Oocyten durchgeführte heterologe Expression spannungsabhängiger Kanäle ermöglicht mit Hilfe der Voltage-Clamp-Technik die elektrophysiologische Unterscheidung von nicht oder nur sehr langsam inaktivierenden, verzögert gleichrichtenden Kanälen (Delayed Rectifier) (Frech, VanDongen et al. 1989) und schnell inaktivierenden transienten Kanälen (A-Typ) (Connor und Stevens 1971; Choi, Aldrich et al. 1991).

Zwei Mechanismen werden bei der Inaktivierung von Kv-Kanälen unterschieden: Zum einen die langsame C-Typ Inaktivierung, welche auf einer Konformationsänderung des äußeren Teils der Pore beruht und zum anderen die schnelle N-Typ Inaktivierung, welche auf einem Verschluss der Pore durch einen Teil des N-Terminus des Kanals beruht, der sog. „Ball-and-chain-reaction“ (Hoshi, Zagotta et al. 1990; Choi, Aldrich et al. 1991; Zhou, Morais-Cabral et al. 2001).

Als Beispiel für die vielen verschiedenen Funktionen der Kaliumkanäle soll an dieser Stelle etwas genauer auf die Rolle der schnell inaktivierenden Kv4-Kanäle eingegangen werden. Sie stellen die Homologa der Vertebraten zum Shal Gen von *Drosophila* dar (Pak, Baker et al. 1991). Der Kv4.2- und der Kv4.3-Kanal spielen eine wichtige Rolle bei der frühen Phase der Repolarisation von Aktionspotentialen im Herzmuskel der Ratte (Yeola und Snyders 1997; Faivre, Calmels et al. 1999). Im humanen Myokard überwiegt wahrscheinlich die Wirkung des dem Kv4.2-Kanals sehr ähnlichen Kv4.3-Kanals (Fiset, Clark et al. 1997; Ohya, Tanaka et al. 1997; Zhu, Wulf et al. 1999). Dieser schnell inaktivierende Strom wird als transienter Auswärtsstrom (I_{to}) bezeichnet (Nerbonne 2000). Kv4-Kanäle sind außerdem als das Korrelat des somatodendritischen neuronalen A-Typ-Stromes anzusehen. Die Dichte

dieser A-Typ-Kanäle nimmt in bestimmten Neuronen vom Soma zu den Dendriten hin zu. Dies bewirkt eine Hemmung der Aktionspotentialgeneration in den Dendriten und eine Abschwächung von rückläufigen Aktionspotentialen. Die hohe Dichte von A-Typ-Kanälen und deren postsynaptische Lokalisation (Alonso und Widmer 1997) in den Dendriten vermindert die Amplitude von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP). Andererseits führt die EPSP-vermittelte Depolarisierung auch zu einer temporären Inaktivierung der A-Typ-Kanäle. Wenn daraufhin, in einem Zeitfenster von etwa 15-20 ms, ein Aktionspotential die Postsynapse erreicht, kann seine Amplitude enorm erhöht werden (Koinzidenzdetektion). Solche postsynaptischen Vorgänge spielen bei der Langzeitpotenzierung (LTP) eine wichtige Rolle (Hoffman, Magee et al. 1997; Yuste 1997; Johnston, Hoffman et al. 2000).

1.4 Peptidtoxine

Für die Shaker-homologen (Kv1) Kaliumkanäle (und für die Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle) sind bereits eine Reihe von an sie bindende Peptidtoxine beschrieben, die z.B. aus dem Gift von Skorpionen stammen, wie Charybdotoxin (Goldstein und Miller 1993; Goldstein, Pheasant et al. 1994; Miller 1995), Agitoxin (Gross und MacKinnon 1996) und Kaliotoxin (Aiyar, Withka et al. 1995). Des weiteren wurden Toxine aus dem Gift von Schlangen (Dendrotoxin) (Harvey und Anderson 1985; Grissmer, Nguyen et al. 1994) und Conusschnecken (κ -Conotoxin PVIIA) (Terlau, Shon et al. 1996) charakterisiert. Aus dem Gift der Seeanemone gelang es, die für den Kv3.4-Kanal spezifischen Toxine BDS-1 und BDS-2 zu isolieren (Diochot, Schweitz et al. 1998).

Diese Toxine haben sich in der Vergangenheit bereits als wertvolle Hilfsmittel in der Grundlagenforschung erwiesen. So konnten mit Hilfe von Agitoxin Schätzungen über die Dimensionen und die Lokalisation der Pore von Shaker- bzw. Kv1.3-Kanälen gemacht werden (Hidalgo und MacKinnon 1995) (Gross, Abramson et al. 1994) und α -Dendrotoxin wurde erfolgreich bei der

Isolierung von Kaliumkanaluntereinheiten aus Säugetiergehirnen (Parcej, Scott et al. 1992) (Reid, Pongs et al. 1992) und bei der Charakterisierung der heteromultimeren Zusammensetzung von Kv-Kanälen verwendet (Scott, Rettig et al. 1994).

Aus dem Gift von Vogelspinnen konnten ebenfalls Peptidtoxine isoliert werden, wie Heteropodatoxin, Phrixotoxin oder Stromatopelmatoxin (Sanguinetti, Johnson et al. 1997; Diochot, Drici et al. 1999; Escoubas, Diochot et al. 2002). Diese zeigten im Gegensatz zu den anderen bekannten Toxinen eine ausgeprägte Wirkung auf Kv4- (und Kv2-) Kanäle. Phrixotoxin wurde bei der Aufklärung der Rolle des Kv4.2-Kanals beim Aktionspotential im Mäusemyokard eingesetzt (Diochot, Drici et al. 1999). Das wohl bis zum heutigen Zeitpunkt am genauesten charakterisierte Toxin aus dieser Gruppe, ist das aus dem Gift von *Grammostola spatulata* isolierte Hanatoxin (HaTx), welches eine besonders hohe Affinität für den Kv2.1-Kanal hat (Swartz und MacKinnon 1995).

Es gibt auch Spinnentoxine, welche eine Wirkung auf andere spannungsaktivierte Kanäle haben. Die Spinnentoxine Pro-Tx1 und Pro-Tx2 zeigen eine Wirkung auf spannungsabhängige Natriumkanäle (Middleton, Warren et al. 2002) und auf verschiedene spannungsabhängige Calciumkanäle wirken Omega-agatoxin-IVA (P-Typ) und Omega-grammotoxin-SIA (N- und P-Typ) (Lampe, Defeo et al. 1993; McDonough, Lampe et al. 1997; McDonough, Mintz et al. 1997). Ihnen ist gemein, dass für sie alle eine wichtige Bindungsstelle im Bereich der Segmente 3 und 4 (S3-S4) des jeweiligen Kanals nachgewiesen wurde (Li-Smerin und Swartz 1998; Winterfield und Swartz 2000) bzw. im Falle der Pro-Tx1 und -2 angenommen wird und dass sie durch ihre Bindung das kinetische Verhalten des Kanals verändern. Omega-agatoxin-IVA z.B. beschleunigt die Deaktivierung des Kanals und verlangsamt dessen Aktivierung bzw. verschiebt die Spannungsabhängigkeit zu positiveren Potentialen. Für Ca^{2+} -Kanäle gibt es auch Toxine von Skorpionen, wie das Kurtoxin, welche wie die bereits erwähnten Spinnentoxine ebenfalls eine gating-modifizierende Wirkung haben (Sidach und Mintz 2002).

Die Wirkung der genannten Toxine beruht nicht auf einer Okklusion der Pore, sondern auf einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu positiveren Potentialen. Durch Bindung des Toxins im Bereich des Spannungssensors wird der geschlossene Zustand des Kanals stabilisiert. Im Bezug auf Na⁺-Kanäle gibt es auch noch andere „Gating-modifizier“, wie die β -Skorpion-Toxine, welche ebenfalls durch Bindung im S3-S4-Bereich des Kanals eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung, in diesem Fall jedoch zu negativeren Potentialen, bewirken (Cestele, Qu et al. 1998).

1.5 Arbeitshypothese und Fragestellung

Da bereits Kv4-Kanal-inhibierende Peptidtoxine aus Giften verschiedener Taranteln isoliert wurden, war es zunächst Ziel dieser Arbeit aus den Giften anderer Tarantelspezies weitere K⁺-Kanal-Inhibitoren zu isolieren (Swartz und MacKinnon 1995; Sanguinetti, Johnson et al. 1997; Diochot, Drici et al. 1999; Escoubas, Diochot et al. 2002).

Als Ausgangsmaterial wurde das Gift der Vogelspinne/ Tarantel *Theraphosa leblondi* verwendet, welches von Catherine Guette, Marie-Louise Celerier (Chimie et Biochimie des Substances Naturelles, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris) und Christian Legros (Laboratoire Analyse et Environment, Institut des Sciences, Universite d'Evry Val-d'Essonne, Evry Cedex, Frankreich) zur Verfügung gestellt wurde (s. Material und Methoden – Gift und Toxine).

In elektrophysiologischen Experimenten konnte eine Inhibierung der neuronalen A-Typ-Stromkomponente und eine spezifische Hemmung von Kv4-Strömen durch das Gift gezeigt werden. Nach Auftrennung des Giftes in einzelne Fraktionen sollten dann die aktiven Komponenten des Giftes identifiziert werden. Des weiteren sollte geprüft werden, ob es sich bei einer der isolierten Komponenten um ein gating-modifizierendes Peptid handelt. Hierzu wurde in elektrophysiologischen Experimenten die Wirkung auf verschiedene Gating-Parameter wie Aktivierung, Inaktivierung und Deaktivierung des Kv4.2-Kanals gemessen. Außerdem sollte durch Konstruktion einer Chimäre aus einem für das Gift sensitiven und einem für

das Gift insensitiven Kanal die Region des Kanals bestimmt werden, welche für die Interaktion mit der aktiven Komponente entscheidend ist.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologie

2.1.1 Lösungen und Medien

- LB-Agar mit Ampicillin:

Für 1000 ml H₂O: 10 g Bacto-Pepton (BD), 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar, pH-Wert auf 7,4 einstellen, 100 mg Ampicillin (Konz.:100 µg/ml)

- LB-Ampicillin-Medium:

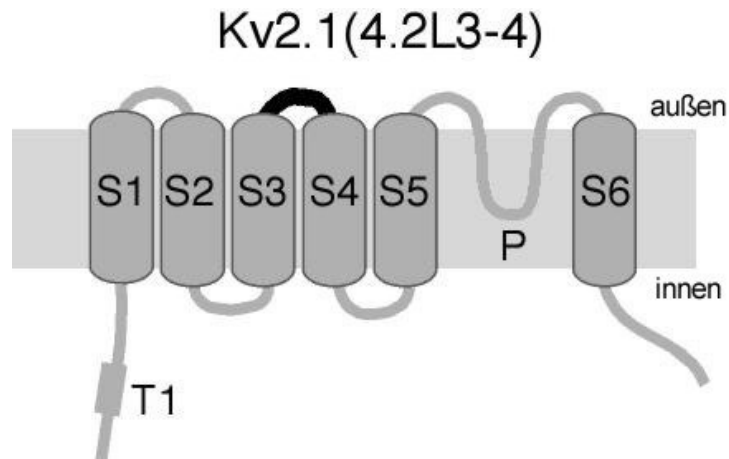
Für 1000 ml H₂O: 10 g Bacto-Pepton (BD), 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, pH-Wert auf 7,4 einstellen, 100 mg Ampicillin (Konz.:100 µg/ml)

2.1.2 Verwendete Klone

Für die heterologe Expression wurden die Kanäle Kv1.3, Kv1.4, Kv2.1, Kv3.4 und Kv4.2 und EGFP im pcDNA3-Expressionsvektor (Invitrogen) mit Resistenz gegen Ampicillin verwendet. Mit Ausnahme des Kv3.4-Kanals, welcher von der Ratte stammte, waren alle Kanäle humanen Ursprungs.

Außerdem wurden eine am N-Terminus um 40 Aminosäuren verkürzte Variante des hKv4.2-Kanals (Kv4.2Δ40) (Zhu, Wulf et al. 1999) und eine Kv2.1(4.2 S3-S4)-Chimäre verwendet. Bei dieser Chimäre wurden die Aminosäuren 271 bis 294 der Linker-Region zwischen den Segmenten 3 und 4 (S3-S4) des Kv2.1-Kanals durch die entsprechende Region des Kv4.2-Kanals ausgetauscht (Aminosäuren 275 bis 293) (s. Abb 2).

A



B

	<u>S3</u>	<u>S4</u>
Kv2.1(4.2L3-4)	PLNAIDLLAILPYY IGLVMTDNEDVSGAF	VTL RIMRILRILKLARHSTGL
Kv2.1wt	PLNAIDLLAILPYYVTIFLTESNKSVLQFQNVRRVQIFRIMRILRILKLARHSTGL	
Kv4.2wt	VMSIIDVVAILPYY IGLVMTDNEDVSGAF	VTL RVFRVFRIFKFSRHSQGL

Abb. 2:

(A) Schematische Darstellung der Kv2.1(4.2 S3-S4)-Chimäre in der Zellmembran. Schwarz dargestellt ist der vom Kv4.2-Kanal stammende S3-S4-Linker. Der restliche, grau dargestellte Teil des Kanals stammte vom Kv2.1.

(B) Aminosäuresequenzen der Linker-Regionen der Kanäle Kv2.1(4.2 S3-S4), Kv2.1wt (Aminosäuren 271 bis 294) und Kv4.2wt (Aminosäuren 275 bis 293).

2.1.3 Re-Transformation kompetenter Zellen

1 µg des Vektors wurde zu 40 µl kompetenter E. coli XL 1-blue in einem sterilen Eppendorf Tube gegeben. Nach 2-5 min auf Eis wurden die Ansätze für ca. 1 min auf 42°C erhitzt (heat shock) und anschließend für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden dann auf LB-Ampicillin-Agar (Plattenvolumen 25 ml) ausplattiert und über Nacht (15-18 Std.) bei 37°C inkubiert.

2.1.4 Plasmid-Isolierung

Eine Einzelkolonie plasmidtragender E. coli wurde mit einem sterilen Zahnstocher von der Agar-Platte aufgenommen und in eine 500 ml Kulturflasche mit 50 ml LB-Ampicillin-Medium gegeben. Der Ansatz wurde zunächst für mehrere Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann über Nacht bei 37 °C im Warmluftschüttler (225 U/min) inkubiert.

Die Isolierung/ Aufreinigung der Plasmide erfolgte mit Hilfe des Nucleobond PC Kit (Nucleobond) basierend auf alkalischer Lyse der Bakterienzellen.

Die DNA-Konzentration der resultierenden wässrigen Lösungen wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Dazu wurden die Lösungen verdünnt und gegen H₂O als Leerwert gemessen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht 1 OD₂₆₀ (optische Dichte bei 260 nm) einer Konzentration von 50 µg/ml. Durch Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Protein) wurde die Reinheit des Produktes überprüft, wobei das angestrebte Verhältnis von A₂₆₀ / A₂₈₀ von 1,7 – 2,0 stets erreicht wurde.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Lösungen und Medien

HEK-Kulturmedium/ Nährmedium:

500 ml Dulbecco's MEM (Minimal Essential Medium)/ NUT Mix F12 (Invitrogen) wurde eine Mischung aus 50 ml hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (Seromed Biochrom) und 5 ml einer Penicillin/ Streptomycin/ Glutamin-Lösung (Invitrogen) zugesetzt

PBS:

Dulbeccos Phosphatgepufferte Salzlösung (Invitrogen)

Trypsin-Lösung:

Trypsin-EDTA (1x) in HBSS (Invitrogen)

2x BES-Lösung:

50 mM BES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH-Wert-Einstellung mit HCl auf 7,3

2.2.2 Routinehaltung (Lindl 2000)

Als heterologes Expressionssystem für elektrophysiologische Experimente mit Kv-Kanälen wurden HEK 293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) verwendet. Die Arbeiten mit den Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank in einem vom übrigen Labor abgetrennten Raum durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Heraeus) unter Standardbedingungen (37 °C, 95% relative Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂).

Wenn eine zu etwa 80% konfluente zweidimensionale Bedeckung der Zellkulturflaschen mit 25 cm² Kulturfläche (Standardkulturfläche „Easy-Flask“, Nunc) erreicht war (meist nach 2-3 Tagen), wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmalig mit 5 ml PBS gewaschen und bei Raumtemperatur bis zur Ablösung vom Boden (mikroskopische Kontrolle) mit 5 ml Trypsin-Lösung inkubiert. Die Proteasereaktion wurde durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde nach Überführung in ein verschließbares 10 ml Plastikröhrchen zentrifugiert (Heraeus, 5 min, 1000 U/min, 25 °C). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Sediment in frischem Medium resuspendiert (Trituration mit rundgeschmolzener Pasteurpipette). Nach Bestimmung der Zellzahl pro ml Medium mittels einer Neubauer-Zählkammer erfolgte die Verteilung im gewünschten Verhältnis auf Kulturflaschen mit vorgelegtem Medium. Es wurden in der Regel Zelldichten von 2-6 x 10⁴ Zellen pro ml Medium (bei 6 ml Medium pro Kulturflasche) verwendet. Nach 2-3 Tagen im Brutschrank unter Standardbedingungen hatten die Zellen eine ausreichende Dichte erreicht und das zugegebene Kulturmedium war verbraucht, so dass die Zellen erneut passagiert wurden.

Für die elektrophysiologischen Messungen wurden 35 mm - Kulturschalen mit 8,8 cm² Kulturfläche (Nunc-Standard-Dishes, Nunc) verwendet. Um die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Zelloberflächen und dem Boden der Kulturschalen zu vergrößern, wurde die

Zahl der positiven Ladungen am Boden durch „Polylysinieren“ erhöht (Jacobson und Branton 1977): Hierzu wurde Poly-L-Lysin Hydrobromid (Sigma) in H₂O gelöst (0,1 mg/ml) und 2 ml der Lösung für ca. 30 min in den Kulturschalen belassen. Nach Absaugen der Lösung und einer mehrstündigen Trocknungszeit waren die Schalen gebrauchsfertig. Die Haftung der Zellen am Boden der Kulturschalen wurde dadurch erhöht und erleichterte die elektrophysiologischen Messungen.

Nach Bestimmung der Zellzahl in der Routinehaltung wurden neben der Befüllung der Kulturflaschen außerdem die Kulturschalen, welche später als Messkammern verwendet wurden, mit je 2 ml Kulturmedium und einer Zellkonzentration von $1-2 \times 10^4$ Zellen pro ml befüllt. Nach ca. 24 Std. im Inkubator wurde dann in den Kulturschalen die Transfektion durchgeführt.

2.2.3 Transfektion

Bei der Transfektion unterscheidet man zwischen mechanischen (z.B. Mikroinjektion), elektrischen (Elektroporation) und chemischen Verfahren. Zwei der chemischen Verfahren wurden in dieser Arbeit verwendet.

Unter Transfektion von Zellen versteht man die Einschleusung und Expression fremden genetischen Materials, entweder vorübergehend (transiente Transfektion) oder dauerhaft (stabile Transfektion). Das Prinzip der chemischen Transfektionsverfahren basiert auf einer Komplexbildung zwischen negativ geladenen Nukleinsäuren und positiv geladenen Chemikalien.

Neben der DNA für den im Überschuss zu exprimierenden Kanal wurde EGFP cotransfiziert. Das „Green Fluorescent Protein“ diente als Reporter der erfolgten Plasmidaufnahme der Zellen, da es bei Anregung im UV-Bereich grünlich erstrahlt und leicht zu identifizieren ist (Chalfie, Tu et al. 1994). Es wurde in dieser Arbeit das „enhanced“ GFP verwendet. Durch eine Punktmutation ist bei dieser Variante die Fluoreszenzintensität und -dauer erhöht. Außerdem ist durch Optimierung der Plasmidstruktur die Expression

dieses Proteins gegenüber der Normalvariante erheblich erhöht (Zhang, Gurtu et al. 1996).

2.2.3.1 Die Calciumphosphat-Kopräzipitations-Methode (Chen und Okayama 1987)

Es wurden 1-2 µg pcDNA3-Plasmid-DNA (davon $\frac{4}{5}$ Kanal-DNA und $\frac{1}{5}$ EGFP-DNA), 75 µl 0,25 molare CaCl₂-Lösung und 75 µl 2xBES-Lösung pro 35 mm-Kulturschale gemischt. Die 35 mm-Kulturschalen mit HEK-Nährmedium wurden für ca. 30 min bei 3% CO₂ und sonst Standardbedingungen, in einem Inkubator aufbewahrt. Die angesetzte Transfektionslösung wurde dann in die Kulturschalen getropft. Nach weiteren 12 bis 18 Stunden im Inkubator mit 3% CO₂ wurde der Transfektionsansatz abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 2 ml HEK-Nährmedium wieder in den Standardinkubator (5% CO₂) gegeben. Die HEK-Zellen wurden nach weiteren 24 – 60 Stunden für elektrophysiologische Experimente genutzt.

2.2.3.2 Die Liposomen-Einschluss-Methode (Lipofectamine (Invitrogen) Standardprozedur)

Es wurden 1-2 µg pcDNA3-Plasmid-DNA (davon $\frac{9}{10}$ Kanal-DNA und $\frac{1}{10}$ EGFP-DNA) mit 100 µl Optimem1-Reagenz (Invitrogen) je Kulturschale gemischt. Hierzu wurde eine Mischung aus 3 µl Lipofectamin (Invitrogen) und 100 µl Optimem1-Reagenz gegeben.

Die Schalen mit den Zellen wurden zunächst einmalig mit 2 ml Optimem gewaschen und danach mit 800 µl Optimem befüllt. Nach 30 min im Standardinkubator wurden die ca. 200 µl aus der zuvor angesetzten Lösung auf die Zellen gegeben. Nach 5 Stunden wurde das Transfektionsmedium durch Standardkulturmedium ausgetauscht. Die HEK-Zellen wurden nach weiteren 12 - 36 Stunden für elektrophysiologische Experimente genutzt.

2.3 Neurone

Es wurden Zellen aus Kulturen von primären hippocampalen Neuronen von neugeborenen C57/Bl6 Mäusen verwendet. Da in den entsprechenden Kulturen nicht nur Neurone, sondern auch Gliazellen vorkommen, werden diese als Mischkulturen bezeichnet.

Die verwendeten Neurone wurden freundlicherweise von der Servicegruppe Elektronenmikroskopie unter der Leitung von Michaela Schweizer, ZMNH, Falkenried 94, 20251 Hamburg zur Verfügung gestellt.

(Neuhoff, Roeper et al. 1999)

Die hippocampalen Zellen wurden auf runden Deckgläsern aus Glas mit einem Durchmesser von 12 mm in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² ausplattiert. Die Deckgläser wurden zuvor mit Poly-L-Lysin und Laminin beschichtet, um die Haftung der Zellen zu erhöhen.

Zur Vermeidung übermäßiger Gliaproliferation, wurde in den ersten drei Tagen serumfreies Medium verwendet. Für die weitere Kultivierung wurde serumhaltiges Neuronenmedium mit 1-β-D-Arabinofuranosyl-Cytosin-Hydrochlorid (AraC) versetzt. AraC ist ein Cytosin-Analogon, das die DNA-Polymerase blockiert und dadurch die Zellteilung unterbindet. Dadurch wurde ein frühzeitiges Absterben der Neurone durch Gliaüberwucherung verhindert. Neurone teilen sich im Gegensatz zu den Gliazellen in diesem Stadium nicht mehr.

Nach 3 bis 13 Tagen im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ und Mediumwechsel alle 3 Tage wurden die Deckgläser in 35 mm-Kulturschalen überführt und für elektrophysiologische Experimente verwendet.

2.4 Gift und Toxine

2.4.1 Die Spinnen

In dieser Arbeit wurde das Gift der weiblichen Spinnen der Spezies *Theraphosa leblondi* aus der Gattung der Taranteln/ Vogelspinnen verwendet. Die Spinnen stammen ursprünglich aus Französisch-Guyana und werden im Laboratoire d'Ecologie von Prof. Marie-Louise Celerier an der Universite de Paris gehalten.

Zur Beute der Spinnen gehören neben kleinen Insekten und Heuschrecken auch größere Tiere wie Mäuse oder Frösche. Um Ihre Beute außer Gefecht zu setzen, können sie durch ihren Biss ein Gift injizieren. Ein Biss kann für Menschen zwar schmerzhaft und unangenehm sein, aber außer bei sehr selten vorkommenden allergischen Reaktionen ist der Verlauf meist harmlos (Isbister und Gray 2002; Isbister, Seymour et al. 2003). Nach Ihrer zweiten Metamorphose sind die jungen Spinnen 8 bis 10 cm lang und werden „gemolken“. Das Gift wurde von Marie-Louise Celerier, Catherine Guette (Chimie et Biochimie des Substances Naturelles, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris) und Christian Legros (Laboratoire Analyse et Environment, Institut des Sciences, Universite d'Evry Val-d'Essonne, Evry Cedex, Frankreich) durch elektrische Stimulation der Drüsen der Spinnen gewonnen und zur Verfügung gestellt.

2.4.2 Toxinisolation aus dem Gift

Die Aufreinigung und Massenspektroskopie wurde von Catherine Guette und Christian Legros durchgeführt.

Die diversen Komponenten von Spinnengiften können in drei Klassen eingeteilt werden:

- Niedrig-molekulare organische Moleküle ($M_r < 1000$ Da): Anorganische Ionen und Salze, freie Säuren, Glukose, freie Aminosäuren, biogene Amine, Neurotransmitter und Polyamine
- Polypeptide (3000 - 10000 Da)

- Proteine mit großer molekularer Masse ($M_r > 10000$ Da) : Es gibt Berichte von verschiedenen Neurotoxinen und Enzymen, die nachgewiesen wurden. Es kann sich jedoch im Einzelfall auch um eine Kontamination mit Speichelflüssigkeit o.ä. handeln.

(Escoubas, Diochot et al. 2000)

Die Auftrennung des Giftes in einzelne Fraktionen wurde mit Hilfe der HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) durchgeführt (s. Abb. 3 A, B; freundlicherweise bereitgestellt von Christian Legros).

Fraktionen, welche in elektrophysiologischen Experimenten eine Wirkung auf den Kv4.2-Kanal zeigten, wurden mit Hilfe der Massenspektroskopie weiter untersucht. Die Massenspektroskopie diente der Sicherstellung der Reinheit der Fraktionen und zur Massenbestimmung der einzelnen Peptide. Es wurden monoisotopische Massen von 4184.71 (TITx1), 4192.9 (TITx2) und 4205.88 (TITx3) bestimmt. Da die Trennung von TITx2 und TITx3 nicht in ausreichender Menge durchführbar war, konnte die Aktivität der beiden Peptide auf den Kv4.2-Kanal nicht in isolierter Form nachgewiesen werden.

Die Aminosäurezusammensetzung der Toxine wurde durch MS/MS-Experimente bestimmt. Zum Vergleich mit den isolierten Peptiden sind die Aminosäuresequenzen weiterer bekannter Toxine aus Tarantelgiften mit Aktivität auf Kv-Kanäle dargestellt (s. Abb. 3 C).

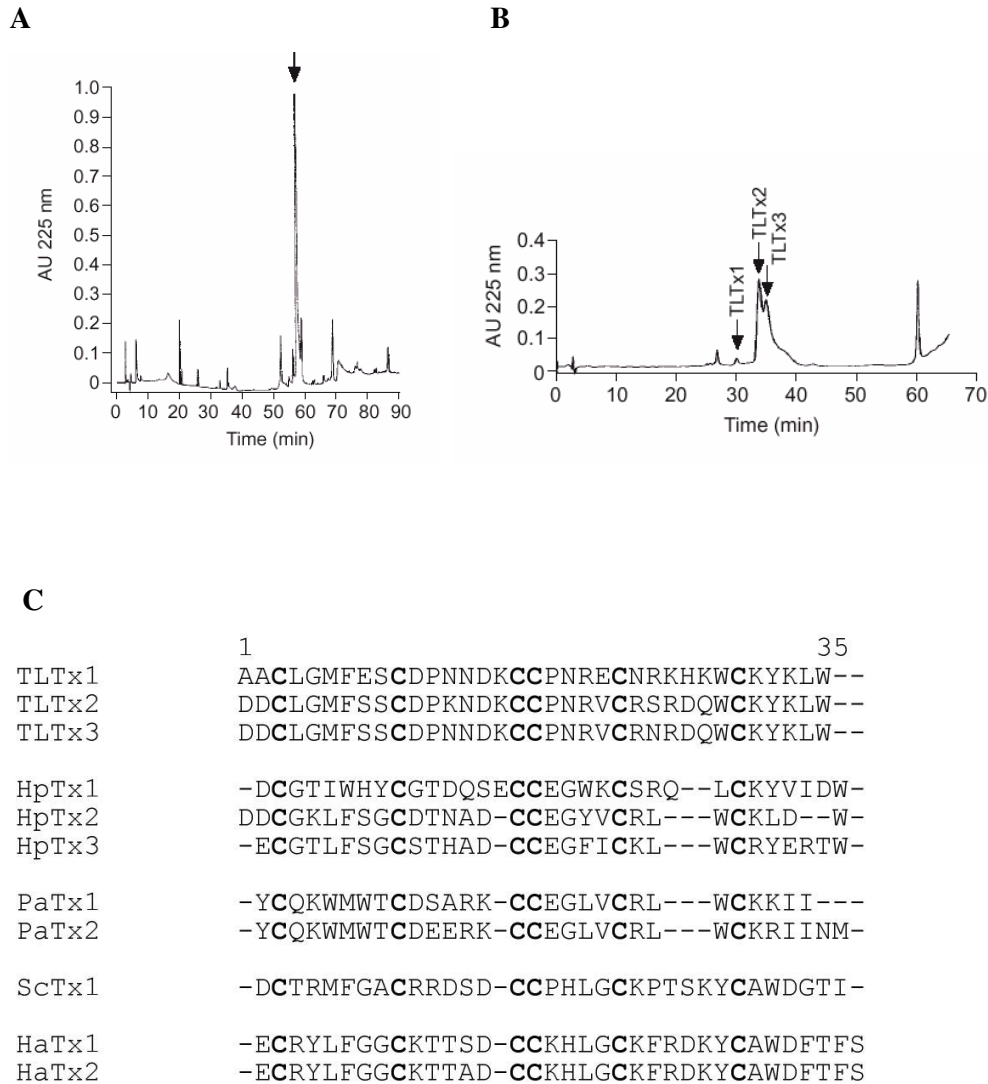


Abb. 3: Freundlicherweise bereitgestellt von Christian Legros

(A) Umgekehrte Phase HPLC, wie es bei der Auftrennung des Giftes von *Theraphosa leblondi* zu beobachten war. Verwendet wurde eine Supercosil LC-318 HPLC Säule equilibriert in 100% mobiler Phase A (0,1% TFA in H₂O). Ein linearer Gradient A von 0 zu 100% mobiler Phase B (Methanol) wurde verwendet.

(B) Weitere Aufreinigung eines Teils des Giftes bei isokratischen Bedingungen (48% Phase B). Drei Peptide, welche Aktivität auf den Kv4.2-Kanal in elektrophysiologischen Tests zeigten, wurden identifiziert (TLTx1, TLTx2, TLTx3).

(C) Aminosäuresequenzen der drei aus dem Gift von *Theraphosa leblondi* isolierten Peptide (TLTx1, TLTx2, TLTx3) und einigen anderen aus Tarantelgiften isolierten Toxinen mit Wirkung auf Kv-Kanäle.

2.4.3 Toxinapplikation

Lyophilisiertes Toxin wurde im Eppendorf-Tube durch Zugabe von ca. 100 μ l PBS-Puffer, mehrmaliges Vortexen und Zentrifugieren resuspendiert. Der Extinktionskoeffizient für die Peptide wurde nach ihrer Aminosäuresequenz kalkuliert. Es wurde dafür das Online-Programm Expasy Protparameter Tool verwendet. Eine optische Dichte von 1 bei einer Wellenlänge von 280 nm entsprach für TITx1 einer Toxinkonzentration von 76,9 μ mol/l. Die Toxinkonzentration wurde dann durch Spektrophotometeranalyse bei 280 nm bestimmt. Durch Lösung einer entsprechenden Menge der Stammlösung konnten die gewünschten Konzentrationen in den Messlösungen hergestellt werden.

Es wurde eine Extrazellulärlösung mit 0,2 % Rinderalbumin (Sigma, A-3294) hergestellt, um unspezifische Absorption an Gefäßen und am Applikationssystem zu verhindern. Das Gift wurde stets in einer Verdünnung von 1:1000 appliziert (z.B. 5 μ l Gift in 5 ml Testlösung), während die zugegebene Toxinmenge je nach gewünschter Konzentration variiert wurde.

Ebenfalls zur Vorbeugung einer unspezifischen Absorption von Toxin an den Oberflächen der Aufbewahrungsbehälter wurden die Oberflächen der Behälter durch Silanisierung verschlossen. Hierzu wurde 5 %iges Dichlordimethylsilan (in Heptan) für 10 min in den Gefäßen belassen, welche anschließend für 8 Std. steril gebacken wurden (Sambrook 1989).

2.5 Elektrophysiologie

2.5.1 Elektrolytlösungen

Extrazelluläre Lösungen (Bad):

Standard-Extrazellulär-Lösung (ec6):

135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 10 mM Sucrose, Phenolrot 0,01 mg/ml

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt (307 mOsm).

Für Experimente mit 135 mM extrazellulärer Rubidiumkonzentration (ec8):

135 mM RbCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 20 mM Sucrose, Phenolrot 0,01 mg/ml

Der pH-Wert wurde mit RbOH auf 7,4 eingestellt (287 mOsm).

Für Experimente mit Neuronen (ec11):

135 mM NaCl, 5 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 10 mM Glukose, Phenolrot 0,01 mg/ml

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt (307 mOsm). Des weiteren wurde der Lösung 500 nM Tetrodotoxin (TTX) zugesetzt. Dies machte es möglich, K⁺-Auswärtsströme in Abwesenheit von Na⁺-Einwärtsströmen zu registrieren.

Intrazelluläre Lösungen (Pipette):

Standard-Intrazellulär-Lösung (ic6):

125 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES

Kurz vor der Verwendung der Lösung wurden noch 2 mM Glutathion und 2 mM K₂ATP zugesetzt

Der pH-Wert wurde mit 1 M KOH auf 7,2 eingestellt (277 mOsm).

Für Experimente mit Neuronen (ic12):

140 mM K-Glukonat, 5 mM KCl, 0,5 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 5 mM EGTA,
10 mM HEPES

Der pH-Wert wurde mit 1 M KOH auf 7,2 eingestellt (308 mOsm).

2.5.2 Versuchsaufbau

Als Messkammern für die Patch-Clamp-Messungen dienten die 35 mm-Kulturschalen aus der Zellkultur, die auf einem beweglichen Objektisch eines Mikroskops fixiert wurden. Da schon geringste Erschütterungen zu einem Abbruch der gerade durchgeführten Messung führen können, wurde das Mikroskop auf einem durch Luftkissen schwingungsgedämpften Tisch gelagert. Zur elektrischen Abschirmung war der gesamte Messstand von einem Faraday-Käfig umgeben, welcher rauscharme Aufnahmen ermöglichte.

Zur Kontrolle der Annäherung der Pipette an die Zelle und zur Identifizierung transfizierter Zellen diente ein Axiovert-Mikroskop (Zeiss). Es wurden Objektive mit 10facher und 40facher Vergrößerung verwendet, zusätzlich ein Okular mit 10facher Vergrößerung, was maximal eine 400fache Gesamtvergrößerung ermöglichte. Zur besseren Kontrastierung wurde ein Phasenkontrast verwendet. Zur Identifizierung transfizierter Zellen, bzw. zum Nachweis der Aufnahme von EGFP, wurde eine HBO-UV-Halogenlampe (Zeiss) benutzt. In den Strahlengang konnte ein Grünfilter vorgeschaltet werden.

Pipetten wurden aus dünnwandigem (Durchmesser: 1,5 mm außen, 1,12 mm innen) Borosilicatglas mit Filament (TW150F-4, World Precision Instruments) hergestellt und innerhalb weniger Stunden verwendet. Die Pipetten wurden in zwei Schritten mit Hilfe eines horizontalen Pipettenziehgerätes (DMZ-Puller, Zeitz Instrumente) gezogen und mit einem glühenden Platin-Iridiumdraht unter einem Mikroskop mit einem Mikromanipulator an den Spitzen rund poliert. Dies erhöhte die Haftung der Pipettenmündung an der Zellmembran und damit die Dichtigkeit der Verbindung. Die Pipettenwiderstände lagen je

nach verwendeter intrazellulärer Lösung zwischen 2 und 3,5 M Ω .

Die Pipette wurde mit Intrazellulärlösung befüllt und in einem Pipettenhalter befestigt. Über einen chlorierten Silberdraht, welcher zu Beginn jedes Versuchstages rechloriert wurde, war die Pipettenlösung mit dem Vorverstärker elektrisch verbunden. Mittels eines hydraulischen Mikromanipulators, an welchem der Vorverstärker montiert war, konnte die Pipette präzise auf die zu messende Zelle positioniert werden.

Die vom Vorverstärker gemessenen Stromsignale wurden als Spannung ausgelesen und an den Hauptverstärker weitergeleitet, welcher das Signal verstärkte und filterte (Filterfrequenzen > 1kHz). Für die Steuerung des Patch-Clamp-Verstärkers, Datenaufnahme und Analyse wurde ein Apple Macintosh G3 verwendet. Das Programm Pulse (HEKA Elektronik) erlaubte über einen Digital-Analog/ Analog-Digital (DA-/AD)- Wandler eine Kommunikation mit dem Verstärker und im Oszilloskopfenster eine graphische Darstellung der gemessenen Stromkurven.

Als Referenzelektrode diente ein im Bad befindliches Silber/ Silberchlorid-Pellet, welches mit dem Vorverstärker verbunden war.

Während der Experimente wurde die Badlösung kontinuierlich ausgetauscht. Dazu wurde als Zulauf eine 50 ml - Spritze ohne Kolben verwendet. Der Auslauf der Spritze war mit einem herkömmlichen Infusionsschlauch inkl. Mechanismus zur Regelung der Flussgeschwindigkeit verbunden. Der Schlauch endete mit einer gebogenen Glaskapillare in der Messkammer. Die durch die Schwerkraft in die Kammer strömende Extrazellulärlösung wurde an der gegenüberliegenden Seite der Messkammer über eine weitere Glaskapillare abgesaugt. Die Ableitung erfolgte über einen Infusionsschlauch und wurde von einer Luftstrahlpumpe, analog einer Wasserstrahlpumpe, angetrieben.

Zur Applikation der Proben wurde ein Mikrosuperfusionssystem benutzt, welches es ermöglichte, kleine Menge von Testlösung auf die gemessene Zelle (mikroskopische Kontrolle) zu applizieren. Es wurde eine peristaltisch angetriebene Schlauchpumpe (BVP-736, Ismatec) verwendet, wodurch die

Zellen, die sich im laminaren Teil der ausströmenden Lösung befanden mit ca. 0,5 ml Lösung pro min überströmt wurden, was einem Bad in der applizierten Lösung gleicht.

2.5.3 Die Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik stellt ein spezielles Voltage-Clamp-Verfahren (Spannungsklemme) dar. Die Hauptaufgabe der Spannungsklemme ist es, Änderungen des Membranpotentials der untersuchten Zelle zu verhindern. Dies wird bei der Patch-Clamp-Technik durch einen besonderen Schaltkreis ermöglicht: Der Vorverstärker, der im wesentlichen einen aus Operationsverstärker, OPA, (A) und Rückkopplungswiderstand (R_f) aufgebauten Strom-Spannungs-Wandler darstellt (s. Abb. 4), erzeugt über einen Rückkopplungsmechanismus einen Kompensationsstrom, welcher genauso groß ist wie der Strom, der durch die Membran fließt, diesem jedoch entgegengerichtet ist (I_p). Am Eingang des OPAs (A) wird die Sollspannung (V_{ref}) angelegt. Der OPA schickt dann so viel Strom durch seinen Rückkopplungswiderstand (R_f), dass die am anderen Pol des OPAs anliegende Spannung aus der Zelle die gleiche ist wie die Sollspannung. Die Sollspannung ist also die Kommandospannung der Spannungsklemme für den Membranpatch unter der Pipettenspitze. Auf Grund seines hohen Eingangswiderstandes fließt dabei durch den OPA fast kein Strom. Der Strom durch den Rückkopplungswiderstand wird also genauso groß sein wie der von der Patchpipette aufgenommene Strom (I_p), aber mit entgegengesetztem Vorzeichen. Dieser Kompensationsstrom wird in Voltage-Clamp-Experimenten gemessen. Er lässt unmittelbar Schlüsse auf die Leitfähigkeit der Zellmembran zu, die u.a. von den in ihr enthaltenen Ionenkanälen bestimmt wird (Aidley 1996; Numberger 1996).

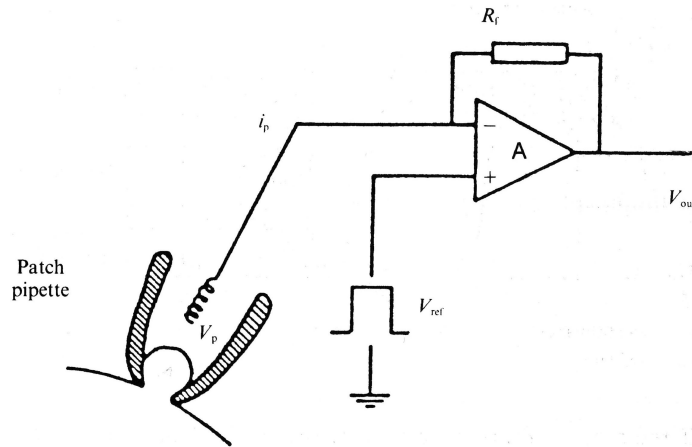


Abb. 4: Schematische Darstellung des Patch-Clamp-Stromkreises (verändert nach (Aidley 1996)). Dargestellt ist ein Teil der Zelle (unten links im Bild), der Operationsverstärker (A), der Rückkopplungswiderstand (R_f), der aufgenommene Strom (I_p), die Sollspannung (V_{ref}) und die gemessene Spannung (V_{out}).

2.5.4 Durchführung der Patch-Clamp-Messungen

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

In die mit intrazellulärer Lösung gefüllte Glaspipette wurde ein am Pipettenhalter befestigter Silberdraht eingetaucht, welcher als Ableitelektrode fungierte. Beim Eintauchen der Pipette in das Bad wurde leichter Überdruck angelegt, um eine Kontamination der Pipettenöffnung mit Partikeln der Lösung und ein Aufsaugen von extrazellulärer Lösung in die Pipette zu vermeiden. Die Offset-Potentiale, die an den Übergängen innerhalb der Messkette Silberdraht – Pipettenlösung – Badlösung – Erdung entstehen, wurden korrigiert. Durch einen 5 ms langen Testpuls von 5 mV wurde der elektrische Widerstand zwischen Bad- und Pipettenelektrode kontinuierlich bestimmt. Die Pipette wurde unter optischer Kontrolle an die Oberfläche der gewählten Zelle herangeführt, bis ein heller Lichtkegel Kontakt signalisierte. Wahlweise wurde auch der Audiomonitor benutzt, der Änderungen der Testpulsamplitude und somit des Widerstandes in Tonsignale umwandelt. Durch Aufheben des Überdrucks und behutsames Saugen wurde die Ausbildung einer sehr engen Verbindung zwischen Zelle und Pipette, dem sog. „Seal“ (Versiegelung), erreicht.

Der sich unter der Öffnung befindliche Membranfleck (Patch) der Zelle wurde dabei von der umgebenden Membranoberfläche elektrisch isoliert. Die Abdichtwiderstände zwischen der Pipette und der Badlösung erreichten Werte im $G\Omega$ -Bereich, weshalb man bei diesem Vorgang von der Bildung eines „Gigaseals“ spricht. Diesen Zustand nennt man Cell-attached oder On-Cell Konfiguration (s. Abb. 5). In diesem Zustand kann die Leitfähigkeit des Membranflecks unter der Pipettenöffnung gemessen werden. Es wurde ein negatives Potential von -50 mV an die Pipettenelektrode angelegt, welches die Sealbildung weiter unterstützte. Dann wurde die schnelle Kapazitätskomponente, die im wesentlichen durch Umladungsvorgänge der Glaspipette entsteht, korrigiert (s. Abschnitt 2.5.5).

Durch vorsichtiges Saugen wurde ein Unterdruck in der Pipette erzeugt, der zum Einreißen des Membranflecks unter der Pipette führte. Damit konnte ein niederohmiger Zugang zum Zellinneren mit Widerständen um 3 bis 9 $M\Omega$ erreicht werden.

Die Öffnung der Membran konnte durch eine neu auftretende, langsamere Kapazitätskomponente, die durch das Umladen der gesamten Zellmembran entstand, erkannt werden (s. Abschnitt 2.5.5). Vor Beginn der Messungen wurde sie ebenso wie der Serienwiderstand elektronisch kompensiert. Die Lösung in der Pipette vermischte sich nach dem Öffnen der Zelle in kurzer Zeit mit dem Zellinneren und war wegen ihres wesentlich größeren Volumens bestimmend für die Zusammensetzung des Zellinneren.

Die in dieser Arbeit ausschließlich verwendete Ganzzellmessung stellt eine Summation der in der Zellmembran befindlichen Leitfähigkeiten dar. Sie stellt nicht nur den Strom unter einem kleinen Membranbereich („Patch“) dar, sondern zeigt das makroskopische Strommuster einer Zelle ohne dass der Betrag der einzelnen Kanäle sichtbar ist.

Die verwendeten Testprotokolle werden im Ergebnisteil beschrieben.

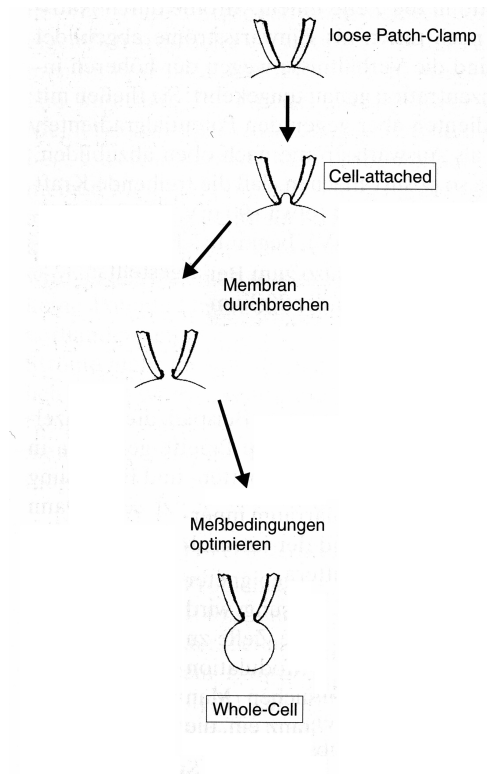


Abb. 5:

Messkonfiguration bei der Whole-Cell Patch-Clamp-Technik (Hamill, Marty et al. 1981)). Dargestellt ist ein Teil der Zellmembran und die aufgesetzte Pipettenspitze.

2.5.5 Kapazitäten, Serienwiderstand, Leckstrom

Die Kapazität ist als pro Spannungsänderung benötigte Ladung definiert.

Beim Voltage-Clamp spielen kapazitive Eigenschaften des Verstärkers, der Glaspipette und der Zellmembran eine wichtige Rolle. Eine Änderung des Kommandopotentials führt nicht sofort zu einer Änderung des Membranpotentials, sondern zunächst zu einer Umladung der Kapazitäten. Die Zeitkonstante τ , welche die Umladung beschreibt, hängt außer von den Kapazitäten C auch noch vom Widerstand R , über den die Umladung stattfindet, ab:

$$\tau = R \times C. \quad (1)$$

Als Antwort auf einen Testpuls zeigen sich schnell ansteigende und exponentiell abfallende transiente Ströme. Man unterscheidet dabei eine schnelle und eine langsame Komponente. Die schnelle Komponente mit Zeitkonstanten von 0,5 bis 8 μs entsteht im wesentlichen durch die Umladung der ins Bad getauchten Pipette. Die langsame Komponente mit

Zeitkonstanten von mehr als 5 μ s entsteht durch die Umladung der Zellmembran. Die Pipette und die Zellmembran wirken als Isolatoren und trennen die Intra- von der Extrazellulärlösung, welches beides leitende Medien sind. Soll die Potentialdifferenz zwischen den Medien verändert werden, werden die Pipette und die Zellmembran als Kondensatoren umgeladen. Die langsame Zeitkonstante ist dabei abhängig vom Widerstand zwischen der Zellmembran und dem Verstärker (R_s), der Kapazität der Zellmembran (C_m) und dem Widerstand über der Zellmembran (R_m) (s. Abb. 6). Da die Umladeströme die Messungen behindern können, werden sie nicht über den Vorverstärker, sondern über einen parallelen Schaltkreis injiziert. Da die Zellmembran über den Pipettenwiderstand (R_s) umgeladen wird, kann dieser neben der bereits erwähnten Verzögerung der Umladevorgänge zu Differenzen zwischen dem Kommandopotential und dem tatsächlich über der Membran anliegenden Potential führen. Der über ihm entstehende Spannungsabfall (dV) ist nach dem Ohmschen Gesetz direkt proportional zum Strom I und zum Pipettenwiderstand R_s :

$$dV = I \times R_s \quad (2)$$

Zur Verbesserung der Membrankontrolle wurde der Spannungsabfall am Serienwiderstand (R_s) elektronisch kompensiert. Dazu wurde dem Kommandopotential noch ein zusätzlicher Teil hinzugefügt, der proportional zum injizierten Strom war und damit den Spannungsabfall über den Serienwiderstand teilweise ausgleichen konnte. In dieser Arbeit wurden Zugangswiderstände von 3 bis 9 $M\Omega$ erreicht, die bis zu 80 % kompensiert wurden.

Der in der Whole-Cell-Konfiguration gemessene Stromfluss wird nicht nur durch spannungsaktivierte Ionenkanäle in der Zellmembran vermittelt. Eine weitere Rolle spielen unspezifische Leckströme. Dies sind lineare Leitfähigkeiten, welche z.B. durch den Ionenfluss durch den Spalt zwischen Zelle und Pipette entstehen. Um diesen Strom, welcher in seiner Größe linear von der Änderung der Membranspannung abhängt, von dem durch spannungsaktivierte Kanäle vermittelten zu subtrahieren, wurde nach der P/n-Methode ein P/5 Leckprotokoll im Anschluss an das Messprotokoll durchgeführt. Dazu wurde ein dem Messprotokoll analoges, jedoch nur 1/5 der Amplitude betragendes Protokoll fünfmal hintereinander durchgeführt,

aufsummiert und dann vom Testpuls abgezogen.

Die ebenfalls in den HEK-Zellen vorkommenden endogenen Kanäle (Jiang, Sun et al. 2002) verschiedener Arten spielen im Vergleich zu den im Übermaß transient transfizierten Kanälen aufgrund ihrer viel geringeren Anzahl nur eine untergeordnete Rolle und können daher bei den Messungen und Auswertungen vernachlässigt werden.

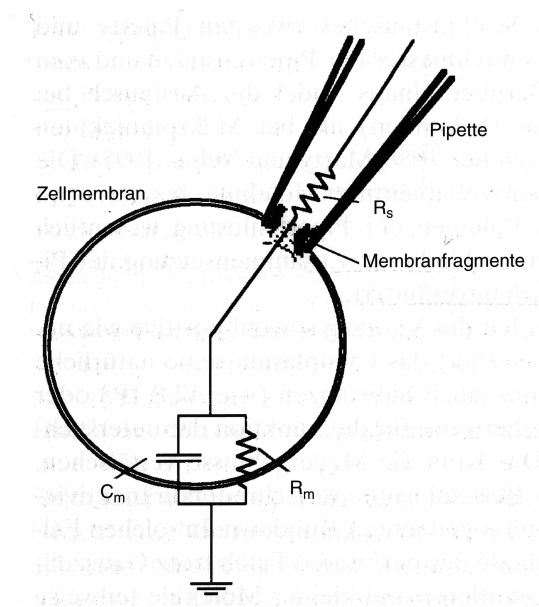


Abb. 6:

Ersatzschaltbild der Ganzzelleableitung (Numberger 1996). Dargestellt ist eine geöffnete Zelle mit aufgesetzter Pipettenspitze, Kapazität der Zellmembran (C_m), Widerstand über der Zellmembran (R_m) und Pipettenwiderstand (R_s).

2.5.6 Aufzeichnung und Auswertung der Daten (Theoretische Grundlagen)

Zur Filterung der eingehenden Messwerte wurde Online ein 3-poliger Bessel-Filter mit einer Sample-Rate von 10 kHz verwendet. Zur Auswertung der Primärdaten und für die Bestimmung der Zeitkonstanten von Inaktivierung und Deaktivierung wurde das „PulseFit“-Programm (HEKA Elektronik) verwendet. Weiterführende Analysen, graphische Darstellungen und statistische Tests erfolgten mithilfe von „Kaleidagraph“ (Synergy Software).

Statistische Analysen mit dem t-test nach Student wurden mit GraphPad InStat 5 (Graph Pad Software, San Diego, USA) durchgeführt.

2.5.6.1 Das Gleichgewichtspotential

Die Verteilung von geladenen Teilchen in wässrigen Lösungen, welche durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt sind, wird vor allem von zwei Prozessen bestimmt: Der Diffusion und der Drift. Der Diffusion liegt ein Konzentrationsgradient und der Drift ein elektrisches Feld zugrunde. Dies trifft auch für die Ionen in Extra- und Intrazellulärflüssigkeit an Zellmembranen zu. Unter Ruhebedingungen ist die Leitfähigkeit der Zellmembran für K^+ im Vergleich zu anderen Ionen mit Abstand am größten. Die intra- und extrazellulären K^+ -Konzentrationen sind daher für das Membranruhepotential ausschlaggebend. In dieser Arbeit wurden in den meisten elektrophysiologischen Experimenten K^+ -Konzentrationen verwendet, welche in etwa denen in den meisten Säugetierzellen entsprechen.

Da die Konzentration von K^+ intrazellulär höher ist als extrazellulär, kommt es so lange zu einem Ausstrom von K^+ aus der Zelle und zu einer Verschiebung des Membranpotentials, bis die elektrischen Wechselwirkungen den weiteren Ausstrom verhindern. In diesem Zustand, den man als elektrochemisches Gleichgewicht bezeichnet, kommt es zu keinem Netto-Ionenstrom mehr durch die Zellmembran. Das Gleichgewichtspotential oder auch Umkehrpotential eines Ions an einer semipermeablen Membran ist also das Potential, an dem sich beide Kräfte aufheben. Mit der Nernst-Gleichung kann das Gleichgewichtspotential (Umkehrpotential/ Nernst-Potential) (E_K) von in ungleichen Konzentrationen über eine semipermeable Membran verteilten geladenen Teilchen, wie z.B. K^+ , berechnet werden.

$$E_K = (-R T / z F) \ln (\text{Konz.}_{\text{ext}} / \text{Konz.}_{\text{int}}) \quad (3)$$

R = allgemeine Gaskonstante (= 8,314 J / (K mol)),

T = absolute Temperatur (= ca. 300 K),

F = Faraday-Konstante (= $9,65 \times 10^4$ A s / mol),

z = Ladungszahl des Ion (= +1 für K^+)

In dieser Arbeit wurde, außer in den Experimenten mit Rb^+ extrazellulär und bei den Experimenten mit Neuronen, eine intrazelluläre K^+ -Konzentration von 125 mM und extrazelluläre K^+ -Konzentration von 5 mM verwendet. Als Kalium-Gleichgewichtspotential ergibt sich daher ungefähr: $E_k = -83 \text{ mV}$.

Zwischen den einzelnen Testpulsen der elektrophysiologischen Messungen wurden die Zellen bei -80 mV gehalten; das entspricht in etwa dem Gleichgewichtspotential für K^+ .

Da Rb^+ sich bezüglich der Kanalselektivität wie K^+ verhält, ergibt sich bei den Experimenten mit einer extrazellulären Rb^+ -Konzentration von 135 mM ein Gleichgewichtspotential von etwa $+2 \text{ mV}$.

2.5.6.2 Leitfähigkeit-Spannungs-Beziehung

Die Leitfähigkeit G ist definiert als Änderung des Stroms pro Änderung der Spannung. Zur Berechnung der Leitfähigkeit wurde die von Hodgkin und Huxley eingeführte Modifikation des Ohmschen Gesetzes verwendet. Diese geht davon aus, dass kein Stromfluss stattfindet, wenn das Membranpotential dem Umkehrpotential der Zelle entspricht.

Die Leitfähigkeit (G) bei einem bestimmten Testpotential (V_m) wurde berechnet aus der gemessenen Peakstromamplitude (I) und dem Umkehrpotential für K^+ -Ströme (V_{rev}).

$$G = I / (V_m - V_{rev}) \quad (4)$$

Die Leitfähigkeit (G) der Kanäle bei einem gegebenen Testpotential (V_m) konnte mit einer Boltzmann-Funktion beschrieben werden.

$$G = G_{max} / \{1 + \exp [(V_{1/2} - V_m) / k]\} \quad (5)$$

G_{max} = Maximale Leitfähigkeit unter Kontrollbedingungen

$V_{1/2}$ = Spannung bei halb-maximaler Leitfähigkeit

k = Steigungsfaktor

2.5.6.3 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Die Dosisabhängigkeit der Reduktion der Stromamplitude wurde mit Hilfe einer logarithmischen Gleichung analysiert.

$$I_{\text{toxin}} / I_{\text{control}} = 1 / \{1 + ([\text{TITx1}] / \text{IC}_{50})^h\} \quad (6)$$

Der Anteil der Stromamplitude $I_{\text{toxin}} / I_{\text{control}}$, welcher in Gegenwart einer bestimmten Konzentration von TITx1 bleibt, ist von der Konzentration abhängig, die für eine halbmaximale Inhibierung benötigt wird (IC_{50}), sowie vom Hill-Koeffizienten h .

2.5.6.4 Zeitkonstanten der Inaktivierung und Deaktivierung

Die Inaktivierungskinetik der Kv4.2-Ströme wurde einer 3-fach-exponentiellen und die Deaktivierungskinetik einer einfach-exponentiellen Funktion angeglichen.

$$I(t) = A_0 + A_1 \exp(-t / \tau_1) + A_2 \exp(-t / \tau_2) + A_3 \exp(-t / \tau_3) \quad (7)$$

für die Inaktivierung

bzw.

$$I(t) = A_0 + A_1 \exp(-t / \tau_1) \quad (8)$$

für die Deaktivierung

$I(t)$ = Amplitude, t = Zeit

A_x = Amplitude des Anteiles des Abfalles, für den die jeweilige Komponente der Inaktivierung bzw. Deaktivierung verantwortlich ist

τ = Zeitkonstanten der Inaktivierung bzw. der Deaktivierung

3 Ergebnisse

3.1 *Theraphosa leblondi* – Gift (Venom)

3.1.1 Inhibierung der A-Typ-Stromkomponente in Neuronen

Die Untersuchung des von der Tarantel *Theraphosa leblondi* gewonnenen Giftes begann mit der Charakterisierung seiner Wirkung auf an kultivierten hippocampalen Neuronen gemessene Ströme. Es wurden Ströme von den Somata von 3 – 14 Tage in Kultur gehaltenen Neuronen in der Whole-Cell Patch-Clamp Konfiguration abgeleitet.

Von besonderem Interesse war die Wirkung des Giftes auf die in den Neuronen vorkommenden spannungsabhängigen Kaliumkanäle, welche den allergrößten Teil des auswärtsgerichteten Stromes der Neurone vermitteln. Um die Auswärtsströme in Abwesenheit von Na^+ -Einwärtsströmen zu registrieren, wurde der extrazellulären Elektrolytlösung 500 nM Tetrodotoxin (TTX) zugegeben (Narahashi, Moore et al. 1964).

Die Kanäle wurden nach einem 2 s langen hyperpolarisierenden Vorpuls auf -100 mV durch eine Depolarisierung der Zellmembran auf +40 mV aktiviert. Bei einer zweiten Aktivierung durch Depolarisierung auf +40 mV wurde die Zellmembran zuvor für 2 s bei -35 mV gehalten. Dieser konditionierende Vorpuls bewirkte im Wesentlichen eine Inaktivierung der A-Typ-Komponente des Auswärtsstromes. Aus der Subtraktion dieses gemessenen Stromes von der ersten Messung wurde der A-Typ-Strom der Neurone abgeleitet (s. Abb. 7).

Eine A-Typ-Komponente zeichnete sich in den gemessenen Zellen in unterschiedlichem Ausmaß für die Gesamtstromamplitude verantwortlich. Eingeteilt wurden die Ergebnisse nach dem Inaktivierungsverhalten der Ströme: Bei drei verschiedenen Zellen konnten unter Kontrollbedingungen zwei Stromkomponenten unterschieden werden: eine schnell inaktivierende A-Typ-Komponente und eine langsam inaktivierende „Delayed-rectifier“-Komponente (Typ 1 = Abb.7 A,B; n = 3). Bei vier anderen Zellen war eine etwas langsamer inaktivierende A-Typ-Komponente neben der „Delayed-rectifier“-Komponente sichtbar (Typ 2 = Abb. 7 C,D; n = 4). Und bei zwei

weiteren Zellen war keine A-Typ-Komponente beobachtbar (Typ 3 = Abb. 7 E,F; n = 2). Die gleichen Protokolle wurden jeweils unter Kontrollbedingungen (Abb 7. A, C, E) und während Applikation von Venom in einer Verdünnung von 1:1000 bei den gleichen Zellen nacheinander (Abb. 7 B, D, F) ausgeführt. Besonders aus den subtrahierten Stromspuren ist gut erkennbar, dass das Venom selektiv die A-Typ-Komponente des Auswärtsstromes (falls vorhanden) inhibierte. Diese wird überwiegend durch schnell inaktivierende Kaliumkanäle (Kv) vermittelt. Die langsam inaktivierende Komponente des Stromes blieb weitgehend unverändert.

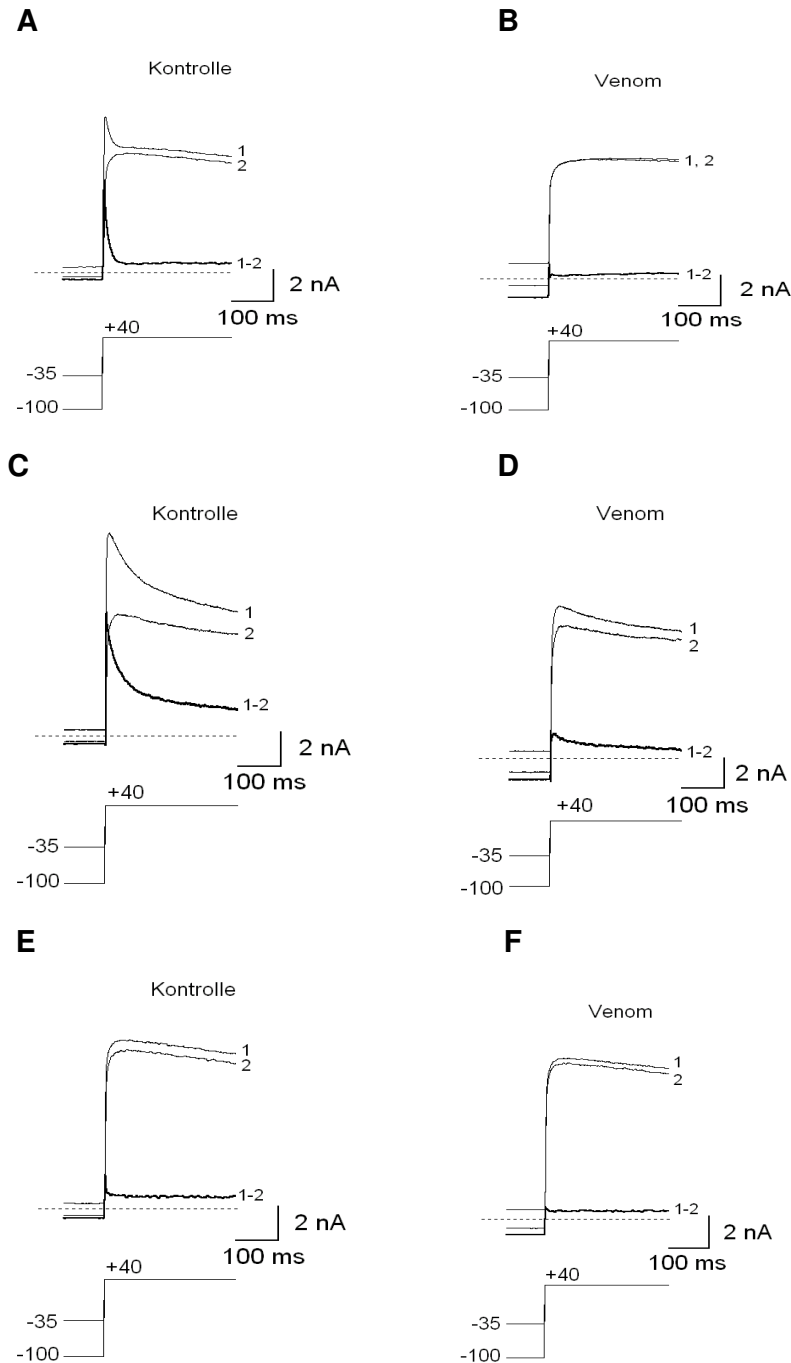


Abb. 7:

K^+ -Ströme wurden in der Whole-cell Patch-clamp Ableitung unter Zugabe von 500 nM TTX in die Extrazellulärlösung gemessen. Dargestellt sind exemplarisch die Ströme, die an drei hippocampalen Neuronen mit unterschiedlichem Kanalbesatz in Anwesenheit einer Kontrolllösung (A, C, E) und unter Zugabe von *Theraphosa Leblondi* Venom in einer Verdünnung von 1:1000 (B, D, F) gemessen wurden.

Typ 1 = (A,B), n = 3; Typ 2 = (C,D), n = 4; Typ 3 = (E,F), n = 2

Der Depolarisierung nach +40 mV ging ein Vorpuls entweder nach -100 mV (Stromspur 1) oder nach -35 mV (Stromspur 2) voraus. Die Subtraktion 1 - 2 zeigt, falls vorhanden, die verbleibende A-Typ Komponente des neuronalen Stromes (Stromspur 1-2). Die zu jedem Zeitpunkt über der Zellmembran anliegende Spannung in mV ist unter den Stromspuren dargestellt. Die Nulllinie der Stromamplitude ist als gestrichelte Linie dargestellt.

3.1.2 Selektive Inhibierung von Kv4-Strömen

Aus den Messungen an Neuronen ging hervor, dass das Venom von *Theraphosa leblondi* schnell inaktivierende, spannungsabhängige Kaliumkanäle inhibiert. Um einen möglichen Zielkanal für das Venom zu ermitteln, wurden in HEK 293-Zellen verschiedene Kv-Subfamilien-Mitglieder transient exprimiert. Zusätzlich zu den unter bestimmten Umständen schnell inaktivierenden spannungsabhängigen Kaliumkanälen Kv1.4, Kv3.4 und Kv4.2 wurden noch der durch seine hohe Affinität für Hanatoxin bekannte Kv2.1-Kanal und zusätzlich der langsam inaktivierende Kv1.3-Kanal, an den viele Skorpiontoxine binden, getestet. Die Kanäle wurden durch Depolarisierung der Zellmembran von einem Haltepotential von -80 mV auf 0 mV aktiviert (s. Abb. 8).

Während die Applikation von Venom in einer Verdünnung von 1:1000 nur zu einer leichten Veränderung der durch die Kanäle Kv1.3 (Abb. 8 A), Kv1.4 (B), Kv2.1 (C) oder Kv3.4 (D) vermittelten Ströme führte (Reduktion der Amplitude auf 90 – 95 % des Kontrollstroms (G)), bewirkte die Applikation des Venoms eine drastische Reduktion der Kv4.2-vermittelten Ströme (E) (Reduktion der Amplitude auf 12 ± 2 % im Vergleich zu Kontrollbedingungen (G)). Dies zeigte, dass von den gemessenen Kanälen nur der Kv4.2, ein schnell inaktivierender Kanal, von dem Venom in größerem Maße moduliert wird. Der Effekt der Inhibierung des Kv4.2-vermittelten Stroms durch das Venom ist weitgehend reversibel (s. Abb. 8 F). Bei diesen Experimenten wurden die Kv4.2-Kanäle durch wiederholte Depolarisierung der Zellmembran mit einer Frequenz von etwa 0,5 Hz von -80 auf 0 mV aktiviert. Diese Frequenz war niedrig genug, um den Kanälen zwischen den Pulsen Zeit zu geben, sich von der Inaktivierung zu erholen.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass das Gift von *Theraphosa leblondi* Komponenten enthält, welche selektiv A-Typ-Kanäle der Kv4-Unterfamilie inhibieren.

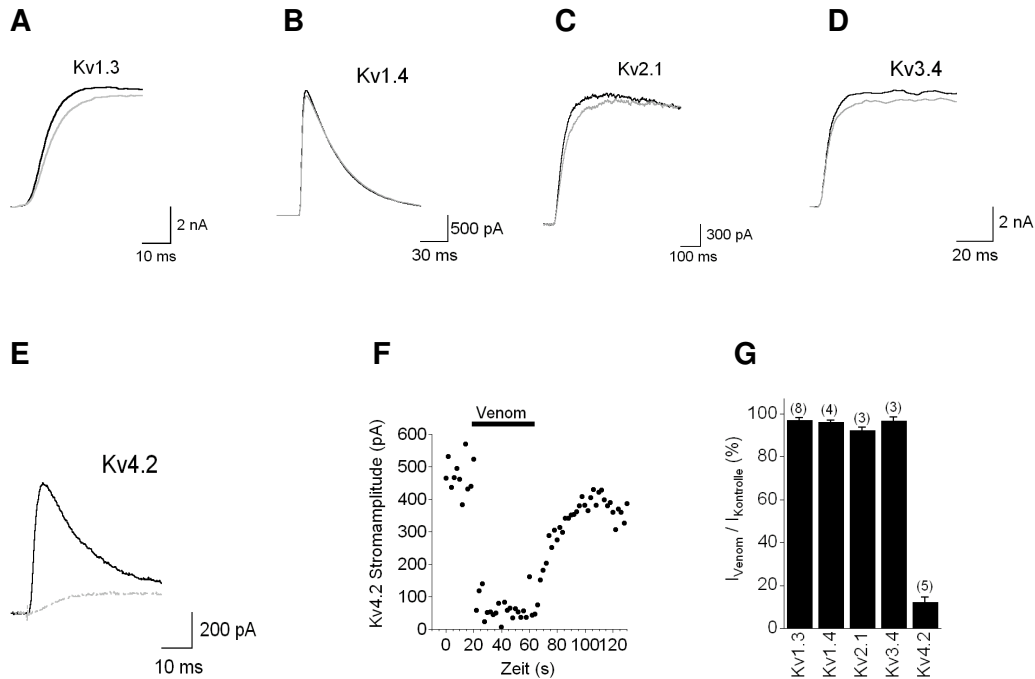


Abb. 8:

Exemplarische Stromkurven vermittelt von verschiedenen in HEK-Zellen exprimierter Kv-Kanäle durch depolarisierende Testpulse nach 0 mV aktiviert. Dargestellt sind Ströme vermittelt durch die Kanäle Kv1.3 (A), Kv1.4 (B), Kv2.1 (C), Kv3.4 (D) und Kv4.2 (E) unter Kontrollbedingungen (schwarz) und während Applikation von Venom in einer Verdünnung von 1:1000 (grau). (F) Zeitabhängigkeit der Stromamplitudenreduktion während wiederholter Aktivierung (ca. 0,5 Hz) der Kv4.2-Ströme. Durch Applikation von Venom in einer Verdünnung von 1:1000 wird die Stromamplitude auf ca. 10 % des Ausgangswertes reduziert. Erneute Applikation von Kontrolllösung führte annähernd zu einer Wiederherstellung der ursprünglichen Stromamplitude. (G) Mittelwerte und Standardfehler der relativen Stromamplituden erhalten während Zugabe von Venom in einer Verdünnung von 1:1000 im Vergleich zu Kontrollbedingungen von verschiedenen Kv-Kanälen in Prozent. Die Zahl der gemessenen Zellen ist in Klammern angegeben.

3.1.3 Veränderung der Inaktivierungskinetik von Kv4.2-Kanälen durch Venom

Die Wirkung des Venoms beschränkte sich nicht auf eine Reduktion der Peakamplitude bei 0 mV, sondern es konnte u.a. auch eine Veränderung der Inaktivierungskinetik von Kv4.2-Strömen beobachtet werden.

Bei Depolarisierung der Zellmembran von -100 auf $+40$ mV bewirkte die Applikation von Venom in einer Verdünnung von 1:1000 eine Reduktion der Peakamplitude auf 83 ± 21 % im Vergleich zum Ausgangsstrom unter Kontrollbedingungen (nicht dargestellt).

Eine Verlangsamung der Inaktivierungskinetik im Vergleich zu Kontrollbedingungen unter Zugabe von Venom in einer Verdünnung von 1:1000 ist bereits bei den dargestellten exemplarischen Stromspuren erkennbar (Abb. 9 A). Die Stromspuren sind auf die Peakamplitude normiert, um die Veränderungen der Inaktivierung besser sichtbar zu machen. Die durch den Kv4.2-Kanal vermittelten Ströme zeigten eine durch drei Komponenten gut beschreibbare Inaktivierungskinetik (Bähring, Boland et al. 2001). Unter Kontrollbedingungen ($n = 4$) war eine schnelle Komponente $\tau_1 = 8,6 \pm 1,1$ ms für $80,3 \pm 3,3$ % des gesamten Abfalls verantwortlich. Eine mittlere Komponente $\tau_2 = 43,5 \pm 5,5$ ms zeigte sich für $14,6 \pm 2,4$ % und eine langsame Komponente $\tau_3 = 686 \pm 94$ ms für $5,1 \pm 0,6$ % des gesamten Abfalls verantwortlich (Abb. 9 B). In früheren Arbeiten wurden vergleichbare Werte für die Inaktivierung von Kv4.2-Kanälen beschrieben (Bähring, Boland et al. 2001).

In Anwesenheit von Venom ($n = 4$) wurden alle drei Zeitkonstanten vergrößert ($\tau_1 = 21,4 \pm 4,4$ ms; $\tau_2 = 87,6 \pm 37,9$ ms und $\tau_3 = 1041 \pm 169$ ms) und die einzelnen Komponenten waren für $78,2 \pm 1,4$ %, $14,3 \pm 1,3$ % und $7,5 \pm 0,6$ % des gesamten Abfalles verantwortlich (Abb. 9 B).

Durch Applikation von Venom konnte eine Verlangsamung, besonders der schnellen Zeitkonstante, im Vergleich zu Kontrollbedingungen beobachtet werden, welche jedoch nicht signifikant war ($p = 0,0654$ für τ_1 , $p = 0,3321$ für τ_2 und $p = 0,1159$ für τ_3). Die Applikation von Venom veränderte die relative Gewichtung der einzelnen Komponenten nicht signifikant.

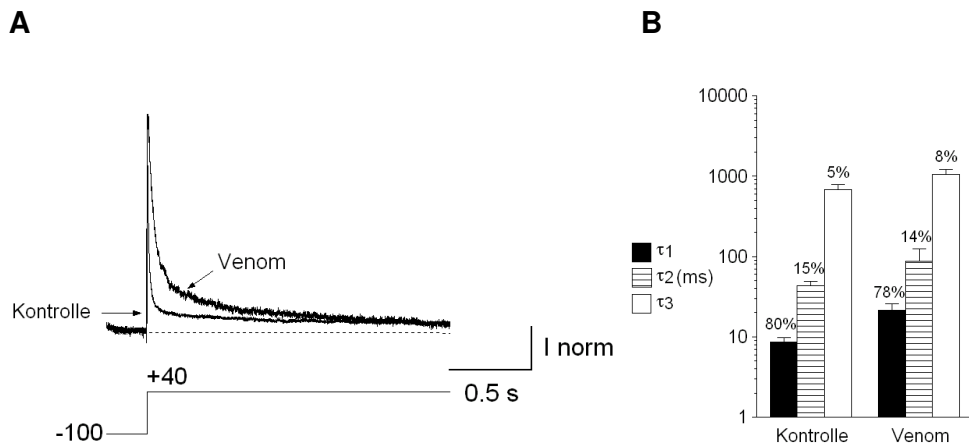


Abb. 9:

(A) Exemplarische Stromspuren in HEK-Zellen exprimierter Kv4.2-Kanäle durch Depolarisierung der Zellmembran auf +40 mV aktiviert während Zugabe von Venom in einer Verdünnung von 1:1000 und unter Kontrollbedingungen. Die Ströme wurden auf die Peakamplitude normiert, um die Veränderung der Inaktivierung besser sichtbar zu machen. Die zu jedem Zeitpunkt über der Zellmembran anliegende Spannung in mV ist unter den Stromspuren dargestellt. Die Nulllinie der Stromamplitude ist als gestrichelte Linie dargestellt.

(B) Zeitkonstanten ermittelt mit einer 3-fach-exponentiellen Beschreibung der Inaktivierungskinetik von Kv4.2-Strömen während einer Depolarisierung nach +40 mV unter Kontrollbedingungen und während Applikation von Venom in einer Verdünnung von 1:1000. Dargestellt sind die Mittelwerte der schnellen (τ_1), mittleren (τ_2) und langsamen (τ_3) Komponente mit ihren Standardfehlern auf einer logarithmischen Skala ($n = 4$). Die Mittelwerte der relativen Gewichtung der einzelnen Komponenten sind in Prozent angegeben.

3.1.4 Wirkung von Venom auf die Aktivierung von Kv4.2-Kanälen

Als nächstes wurden die Auswirkungen der Applikation von Venom auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2-Kanälen untersucht. Die Kanäle wurden durch Spannungssprünge von -100 mV auf Werte von -40 bis +70 mV aktiviert (s. Abb. 10). Applikation von Venom in einer Verdünnung von 1:1000 (Abb. 10 A, rechts) führte u.a. zu einer Reduktion der Stromamplitude im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Abb. 10 A, links). Die aus den Peakamplituden ermittelte Peakleitfähigkeit-Spannungs-Beziehung konnte mit einer Boltzmann-Funktion (s. Material und Methoden, Abschnitt 2.5.6.2) mit einem Steigungsfaktor (k) von 21 mV beschrieben werden (Abb. 10 B). Applikation von Venom in einer Verdünnung von 1:1000 bewirkte eine signifikante Verschiebung von $V_{1/2}$ von $10,2 \pm 1,7$ mV auf $34 \pm 2,4$ mV ($n = 4$; $p = 0,0002$). Der Steigungsfaktor k wurde nicht verändert.

Die Kinetik der Aktivierung der Kv4.2-vermittelten Ströme wurde ebenfalls durch Venom-Applikation verändert. Die Kv4.2-Kanäle wurden erneut durch Spannungssprünge von -100 mV auf Werte zwischen 0 und $+70$ mV aktiviert. Dabei wurde die Zeit bestimmt, welche der Strom benötigt, um von 10% auf 90% der Peakamplitude anzusteigen (s. Abb 10). Applikation von Venom in einer Verdünnung von $1:1000$ bewirkte im gesamten gemessenen Spannungsbereich eine signifikante Verlängerung der Anstiegszeit im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Abb. 10 D). So wurde die $10 - 90\%$ Anstiegszeit z.B. bei 0 mV von $3,4$ auf $17,1$ ms (Abb. 10 C) ($p = 0,0021$) und bei $+70$ mV von $0,7$ auf 3 ms ($p = 0,0002$) verlängert.

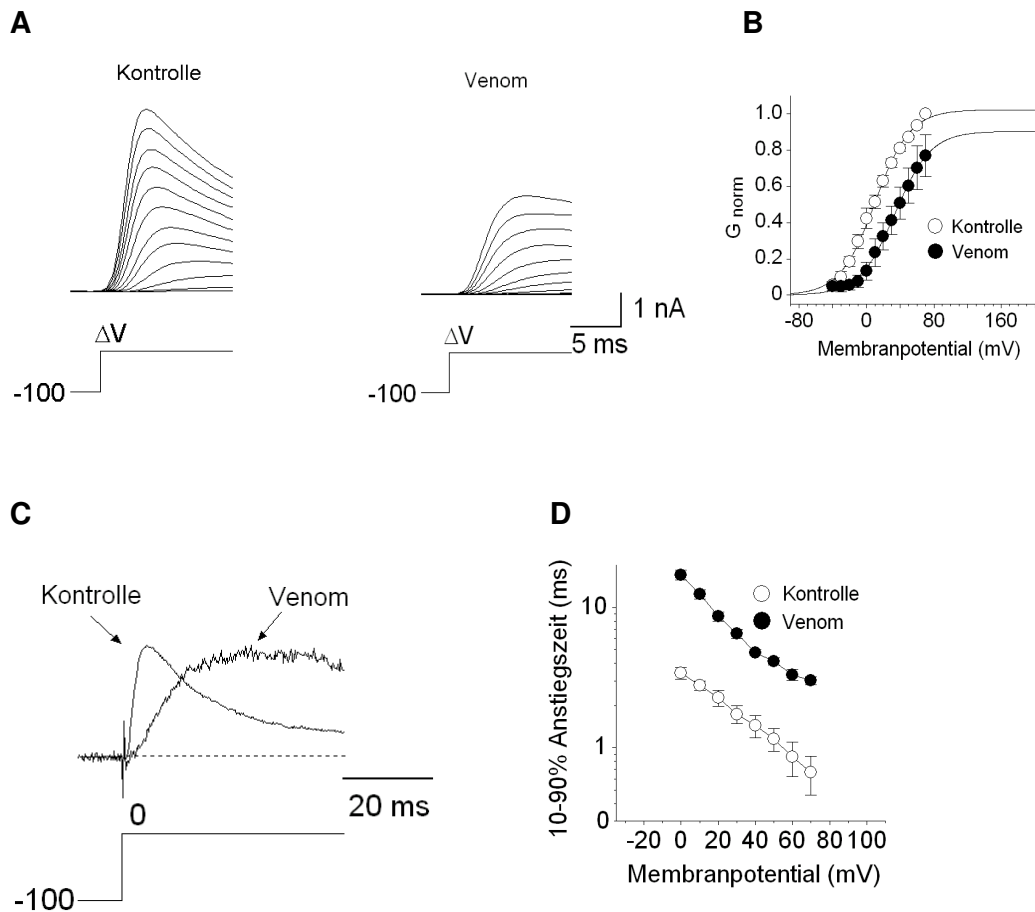


Abb. 10:

(A) Exemplarische Darstellung typischer Stromspuren durch in HEK-Zellen exprimierte Kv4.2-Kanäle vermittelt. Die Kanäle wurden durch Depolarisierung von -100 mV zu sukzessiven Potentialen zwischen -40 und $+70$ mV (ΔV) unter Kontrollbedingungen (links) und während Applikation von Venom in einer Verdünnung von 1:1000 (rechts) aktiviert. Die zu jedem Zeitpunkt über der Zellmembran anliegende Spannung in mV ist unter den Stromspuren dargestellt.

(B) Peakleitfähigkeit-Spannungs-Beziehung von Kv4.2-Strömen unter Kontrollbedingungen und während Applikation von Venom. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler normiert auf die maximale Leitfähigkeit unter Kontrollbedingungen ($n = 4$). Die Spannungsabhängigkeit der Werte konnte mit einer Boltzmann-Funktion ersten Grades beschrieben werden.

(C) Exemplarische Darstellung von Kv4.2-Stromspuren während Depolarisierung der Zellmembran auf 0 mV unter Kontrollbedingungen und während Applikation von Venom. Die Ströme wurden auf die Peakamplitude normiert. Die zu jedem Zeitpunkt über der Zellmembran anliegende Spannung in mV ist unter den Stromspuren dargestellt. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Nulllinie der Stromamplitude.

(D) Mittelwerte und Standardfehler der Anstiegszeiten von 10% auf 90% der Kv4.2-Peakamplitude bestimmt während Zugabe von Venom und unter Kontrollbedingungen aufgetragen gegen das Testpotential ($n = 4$).

3.2 *Theraphosa leblondi* –Toxin 1 (TITx1)

3.2.2 Dosisabhängige Inhibierung von Kv4.2-Strömen durch TITx1

Das Gift der Tarantel *Theraphosa leblondi* wurde mit Hilfe der HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Basierend auf einer ausgedehnten Reihe von Aktivitätstests verschiedener Fraktionen in elektrophysiologischen Experimenten mit dem Kv4.2-Kanal wurden drei Peptidtoxine isoliert (s. Material und Methoden). Die Wirkung eines dieser Peptide (TITx1) auf in HEK 293-Zellen exprimierte Kv4.2-Kanäle wurde mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik genauer untersucht.

Die Applikation von TITx1 bewirkte eine dosisabhängige Reduktion der Stromamplitude im Vergleich zu Kontrollbedingungen bei Membrandepolarisierungen von -100 mV auf 0 mV (s. Abb. 11 A).

Die Dosisabhängigkeit des im Vergleich zu Kontrollbedingungen verbleibenden Anteiles des Peakstromes unter Toxinwirkung konnte mit einer Hill-Gleichung beschrieben werden (Abb. 11 B). Die Konzentration, welche für eine halbmaximale Reduktion der Peakamplitude (IC_{50}) benötigt wurde, war 193 nM. Der aus der Beschreibung durch die Hill-Gleichung resultierende Hill-Koeffizient betrug $1,05$.

Alle weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit TITx1 in einer Konzentration von 200 nM durchgeführt. Bei dieser Konzentration war die Zeitkonstante, mit welcher das Einsetzen der Wirkung des Toxins beschrieben werden kann, 6 ± 1 s ($n = 4$) (Abb. 11 C). Die Wiederherstellung des Ausgangspeakstromes konnte mit einer Zeitkonstante von 14 ± 2 s ($n = 4$) beschrieben werden.

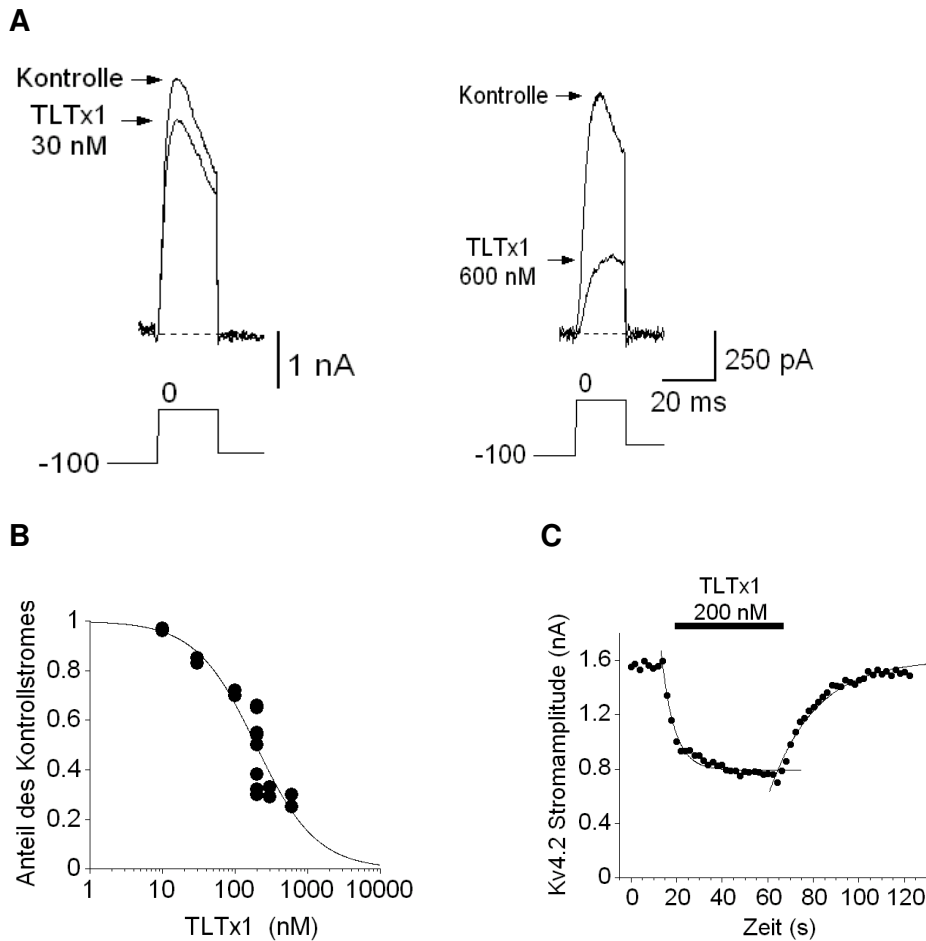


Abb. 11:

(A) Exemplarische Darstellung typischer Stromspuren in HEK-Zellen transfizierter Kv4.2-Kanäle durch depolarisierende Pulse nach 0 mV aktiviert. Zugabe von 30 nM (links) oder 600 nM (rechts) TITx1 führte zu einer Reduktion der Stromamplitude im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Die zu jedem Zeitpunkt über der Zellmembran anliegende Spannung in mV ist unter den Stromspuren dargestellt. Als gestrichelte Linie ist die Nulllinie der Stromamplitude gekennzeichnet

(B) Relative Kv4.2-Peakamplituden bestimmt während Applikation von verschiedenen logarithmisch aufgetragenen Konzentrationen von TITx1 im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Jeder dargestellte Wert entspricht der relativen Peakamplitude bei Depolarisation nach 0 mV bei einer gemessenen Zelle. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung konnte mit einer Hill-Funktion mit einer halbmaximalen Wirkkonzentration von 193 nM und einem Hill-Koeffizienten von 1,05 beschrieben werden.

(C) Zeitabhängigkeit der Peakamplitudenreduktion während wiederholter Aktivierung (0,5 Hz) der Kv4.2-vermittelten Ströme ($\tau_{\text{onset}} = 9 \text{ s}$ und $\tau_{\text{recovery}} = 19 \text{ s}$ für diese Zelle). Durch Applikation von 200 nM TITx1 wurde die Peakamplitude auf etwa 50% des Ausgangswertes reduziert. Erneute Applikation von Kontrolllösung führte zu einer Wiederherstellung der ursprünglichen Peakamplitude.

3.2.3 Veränderung der Inaktivierungskinetik von Kv4.2-Kanälen durch TITx1

Abgesehen von einer Reduktion der Peakamplitude bewirkte TITx1, analog dem Venom, auch eine Veränderung der Inaktivierungskinetik der Kv4.2-vermittelten Ströme.

Bei Depolarisierung der Zellmembran von -100 auf $+40$ mV bewirkte die Applikation von 200 nM TITx1 eine Reduktion der Peakamplitude auf 52 ± 5 % im Vergleich zum Ausgangsstrom unter Kontrollbedingungen (nicht dargestellt).

Eine Verlangsamung der Inaktivierungskinetik unter Zugabe von 200 nM TITx1 im Vergleich zu Kontrollbedingungen ist bereits bei den dargestellten exemplarischen Stromspuren erkennbar. Die Stromspuren wurden auf die Peakamplitude normiert, um die Veränderungen der Inaktivierung besser sichtbar zu machen (Abb. 12 A). Unter Kontrollbedingungen ($n = 5$) war eine schnelle Komponente, $\tau_1 = 8,2 \pm 1,0$ ms, für $80,6 \pm 3,1$ % des gesamten Abfalls verantwortlich. Eine mittlere Komponente, $\tau_2 = 33,9 \pm 4,1$ ms, zeigte sich für $17,4 \pm 2,7$ % und eine langsame Komponente, $\tau_3 = 646 \pm 59$ ms, für $2,9 \pm 0,4$ % des gesamten Abfalles verantwortlich (Abb. 12 B). Diese Werte entsprachen den in vorhergehenden Experimenten bestimmten.

In Anwesenheit von 200 nM TLTx1 ($n = 5$) wurden alle drei Zeitkonstanten vergrößert ($\tau_1 = 18,6 \pm 2,9$ ms, $\tau_2 = 83,0 \pm 17,2$ ms und $\tau_3 = 1269 \pm 265$ ms) und die einzelnen Komponenten waren für $87,2 \pm 1,7$ %, $8,7 \pm 1,5$ % bzw. $4,2 \pm 0,6$ % des gesamten Abfalles verantwortlich (Abb. 12 B).

Durch Applikation von 200 nM TITx1 konnte eine signifikante Verlangsamung besonders der schnellen ($p = 0,0193$) und mittleren ($p = 0,0494$) Zeitkonstante im Vergleich zu Kontrollbedingungen beobachtet werden. Die langsame Komponente wurde nicht signifikant verändert ($p = 0,0834$).

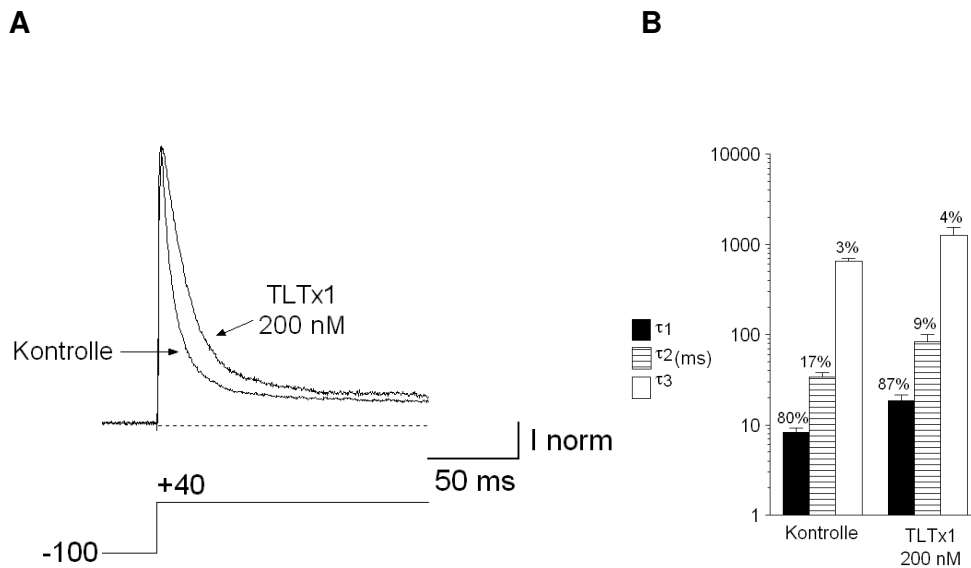


Abb. 12:

(A) Exemplarische Stromspuren in HEK-Zellen exprimierter Kv4.2-Kanäle durch Depolarisierung der Zellmembran auf +40 mV aktiviert während Zugabe von 200 nM TITx1 und unter Kontrollbedingungen. Die Ströme wurden auf die Peakamplitude normiert, um die Veränderung der Inaktivierung besser sichtbar zu machen. Die zu jedem Zeitpunkt über der Zellmembran anliegende Spannung in mV ist unter den Stromspuren dargestellt. Als gestrichelte Linie ist die Nulllinie der Stromamplitude gekennzeichnet.

(B) Zeitkonstanten aus einer 3-fach-exponentiellen Beschreibung der Inaktivierungskinetik von Kv4.2-vermittelten Strömen während einer Depolarisierung nach +40 mV unter Kontrollbedingungen und während Applikation von 200 nM TITx1. Dargestellt sind die Mittelwerte der schnellen (τ_1), mittleren (τ_2) und langsamen (τ_3) Komponente mit ihren Standardfehlern auf einer logarithmischen Skala ($n = 5$). Die Mittelwerte der relativen Gewichtung der einzelnen Komponenten sind in Prozent angegeben.

3.2.4 Wirkung von TITx1 auf die Aktivierung von Kv4.2-Kanälen

Analog zum Venom untersuchten wir die Auswirkungen von TITx1 auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2-Kanälen. Die Kanäle wurden durch Spannungssprünge von -100 mV auf Werte von -50 bis $+100$ mV aktiviert. Die Applikation von 200 nM TITx1 führte zu einer Reduktion der Stromamplitude im Vergleich zu Kontrollbedingungen (s. Abb. 13 A). Die aus den Peakamplituden ermittelte Peakleitfähigkeit-Spannungs-Beziehung konnte mit einer Boltzmann-Funktion (s. Material und Methoden, Abschnitt 2.5.6.2) beschrieben werden (Abb. 13 B). Die Applikation von 200 nM TITx1 bewirkte eine signifikante Verschiebung von $V_{1/2}$ von $+4,5 \pm 1,3$ mV nach

+40,2 ± 2,8 mV (n = 5; p<0,0001) und eine Erhöhung des Steigungsfaktors k von 17,9 ± 1,1 auf 29,1 ± 1,6 mV (n = 4; p = 0,0004).

Die Kinetik der Aktivierung der Kv4.2-vermittelten Ströme wurde ebenfalls durch die Wirkung des Toxins verändert. Die Kv4.2-Kanäle wurden erneut durch Spannungssprünge von -100 mV auf Werte zwischen -20 und +100 mV aktiviert und die Zeit bestimmt, welche der Strom benötigte, um von 10 % auf 90 % der Peakamplitude anzusteigen. Applikation von 200 nM TITx1 bewirkte im gesamten gemessenen Spannungsbereich eine moderate Verlängerung der Anstiegszeit im Vergleich zu Kontrollbedingungen, welche jedoch nur bei starker Depolarisierung signifikant war (Abb. 13 C). So wurde die 10 – 90 % Anstiegszeit z.B. bei +100 mV von 0,8 ± 0,1 auf 1,7 ± 0,3 ms (Abb. 13 D)(n=5; p = 0,0267) verlängert.

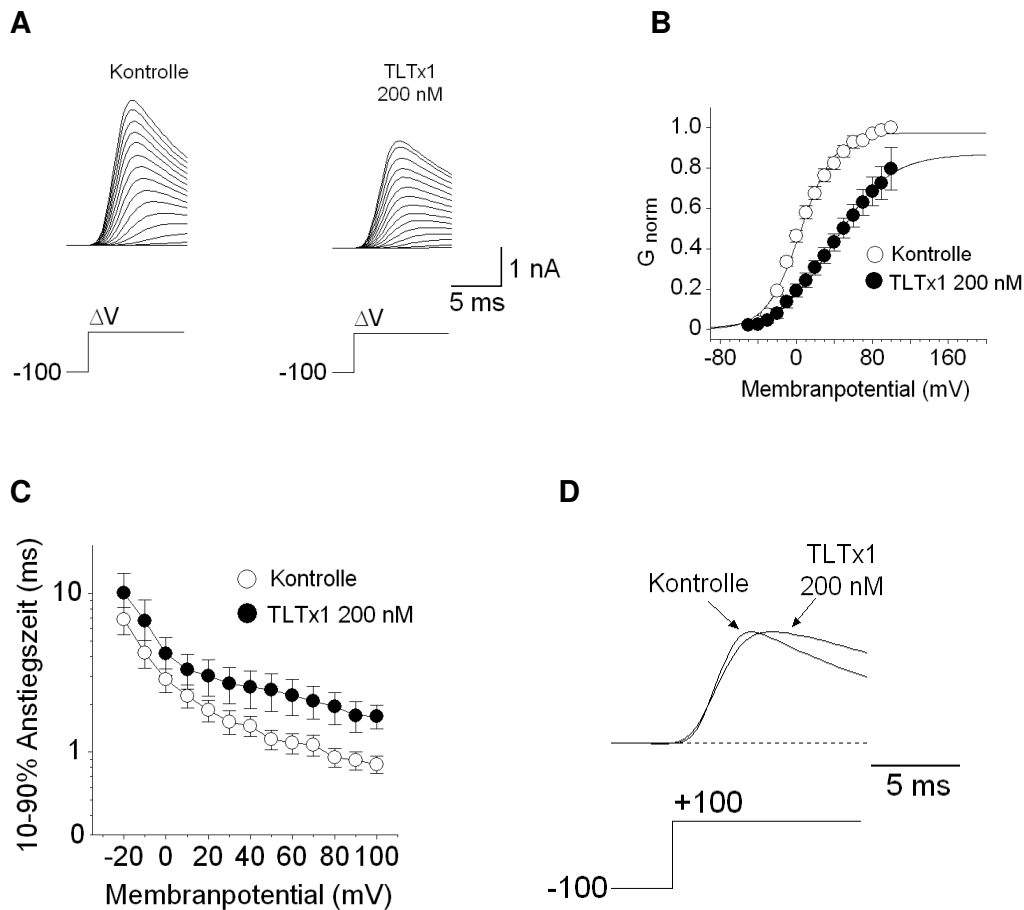


Abb. 13:

(A) Exemplarische Darstellung typischer an HEK-Zellen gemessener durch den Kv4.2-Kanal vermittelter Stromspuren bei Depolarisierung von -100 mV zu sukzessiven Potentialen zwischen -50 und $+100$ mV (ΔV) unter Kontrollbedingungen (links) und während Applikation von 200 nM TITx1 (rechts). Die zu jedem Zeitpunkt über der Zellmembran anliegende Spannung in mV ist unter den Stromspuren dargestellt.

(B) Peakleitfähigkeit-Spannungs-Beziehung von Kv4.2-vermittelten Strömen erhalten unter Kontrollbedingungen und während Applikation von 200 nM TITx1. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler normiert auf die maximale Peakleitfähigkeit unter Kontrollbedingungen ($n = 5$). Die Verteilung der Werte konnte mit einer Boltzmann-Funktion ersten Grades beschrieben werden.

(C) Mittelwerte und Standardfehler der Anstiegszeiten von 10% auf 90% der Kv4.2-Peakamplitude bestimmt während Zugabe von 200 nM TITx1 und unter Kontrollbedingungen aufgetragen gegen das Testpotential ($n = 5$).

(D) Exemplarische Darstellung von Kv4.2-Stromspuren während Depolarisierung nach $+100$ mV unter Kontrollbedingungen und während Applikation von 200 nM TITx1. Die Ströme wurden auf die Peakamplitude normiert. Die zu jedem Zeitpunkt über der Zellmembran anliegende Spannung in mV ist unter den Stromspuren dargestellt. Als gestrichelte Linie ist die Nulllinie der Stromamplitude gekennzeichnet.

3.2.5 Wirkung von TITx1 auf die Deaktivierungskinetik von Kv4.2-Kanälen

Für das ebenfalls aus dem Gift einer Tarantel isolierte Hanatoxin wurde gezeigt, dass es zu einer signifikanten Beschleunigung der Deaktivierungskinetik des Kv2.1-Kanals führt (Swartz und MacKinnon 1997). Um die Wirkung von TITx1 auf die Deaktivierungskinetik von durch den Kv4.2-Kanal vermittelte Ströme zu untersuchen, wurde die Zellmembran zur Öffnung der Kanäle 4 ms lang auf +40 mV depolarisiert. Anschließend wurden bei Testpotentialen zwischen -110 mV und -50 mV die Tail-Ströme gemessen (s. Abb. 14). Der Kinetik der Tailströme wurde eine einfach-exponentielle Funktion angeglichen. Um die Messgenauigkeit bei dieser sehr schnellen Reaktion zu erhöhen, wurde Rb^+ in einer Konzentration von 135 mM als Ladungsträger in der Extrazellulärlösung verwendet. Rb^+ verlangsamt das Schließen der Kanäle durch eine längere Aufenthaltszeit in der Pore im Vergleich zu K^+ (s. Material und Methoden, Abschnitt 2.5.6.1)(Matteson und Swenson 1986; Sala und Matteson 1991).

Bei einem Testpotential von -80 mV bewirkte die Zugabe von 200 nM TITx1 nur eine leichte Beschleunigung der Deaktivierungskinetik im Vergleich zu Kontrollbedingungen von $\tau_{-80} = 7,9 \pm 0,5$ ms auf $\tau_{-80} = 6,7 \pm 0,3$ ms, welche sich als nicht signifikant erwies ($n=4$; $p = 0,1153$) (Abb. 14 A). Diese nicht signifikante leichte Beschleunigung war im gesamten gemessenen Spannungsbereich sichtbar (Abb. 14 B).

Es konnte zuvor gezeigt werden, dass eine Entfernung der ersten vierzig Aminosäuren des N-terminalen Endes des Kv4.2-Kanals (Kv4.2 Δ 40) nicht nur zu einer verlangsamt Inaktivierungskinetik, sondern auch zu einer verlangsamt Deaktivierungskinetik der Mutante im Vergleich zum Wildtyp führt (Bahring, Boland et al. 2001). Die Wirkung dieses N-Terminus verhindert möglicherweise, dass eine Wirkung von TITx1 auf die Deaktivierungskinetik der durch den Kv4.2-Kanal vermittelten Ströme messbar ist. Um diese Hypothese zu prüfen, untersuchten wir die durch den Kv4.2 Δ 40-Kanal vermittelten Rb^+ -Tail-Ströme analog zu denen des Wildtyps. Bei -80 mV bewirkte die Zugabe von 200 nM TITx1 eine signifikante Beschleunigung der Deaktivierungskinetik im Vergleich zu Kontrollbedingungen von $\tau_{-80} = 12,9 \pm$

0,6 ms auf $\tau_{-80} = 7,4 \pm 0,3$ ms ($n=5$; $p < 0,0001$) (s. Abb. 14 C). Diese signifikante Beschleunigung war im gesamten gemessenen Spannungsbereich beobachtbar (Abb. 14 D).

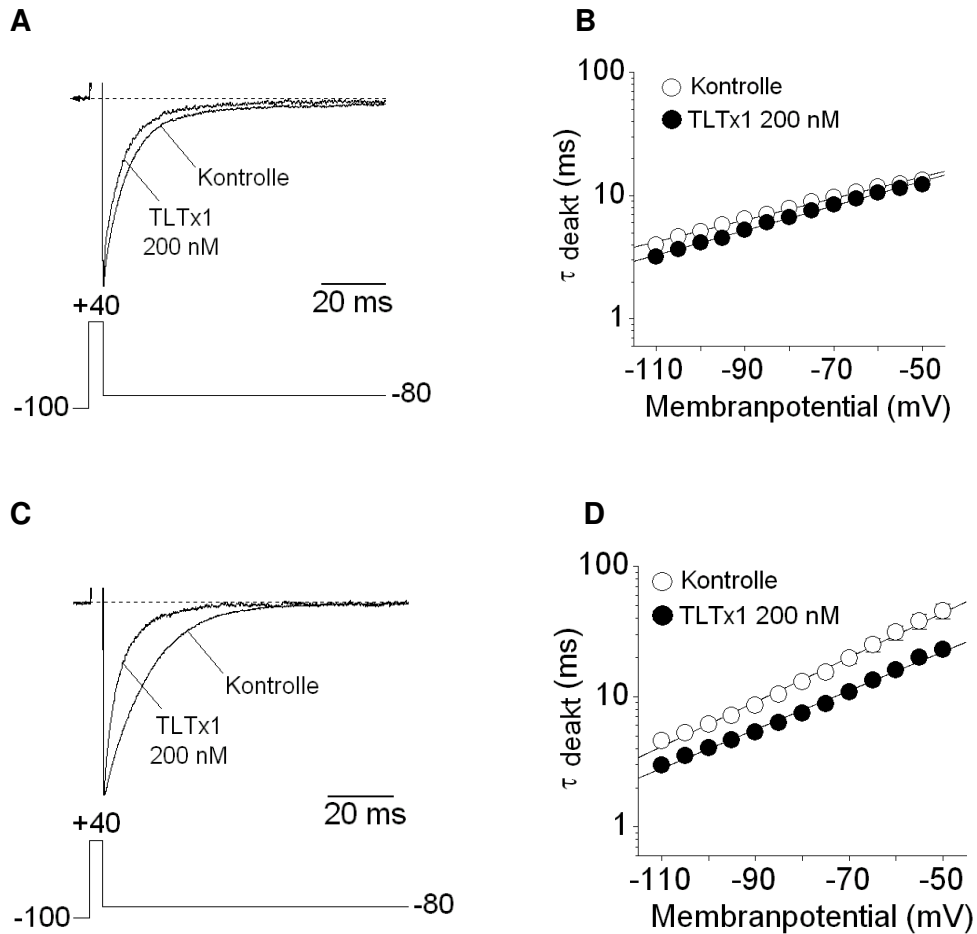


Abb. 14:

Exemplarische Darstellung von Tail-Strömen vermittelt durch den Kv4.2- (A) bzw. Kv4.2(Δ40)-Kanal (C) gemessen an HEK-Zellen bei -80 mV nach einer Depolarisation auf +40 mV für 4 ms. Die Ströme wurden während Applikation von 200 nM TLTx1 und unter Kontrollbedingungen gemessen. Sie wurden auf die negative Peakamplitude normiert und in einer Extrazellulärlösung mit 135 mM Rb⁺ im Austausch für Na⁺ gemessen. Die zu jedem Zeitpunkt über der Zellmembran anliegende Spannung in mV ist unter den Stromspuren dargestellt. Als gestrichelte Linie ist die Nulllinie der Stromamplitude gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardfehler der Zeitkonstanten der Deaktivierung wurden für Kv4.2- (B) und Kv4.2(Δ40)-vermittelte Ströme (D) bestimmt und gegen das Testpotential aufgetragen ($n = 4$ bzw. $n = 5$). Nach einem 4 ms langem Vorpuls, welcher die Kanäle öffnete, wurden als Testpotentiale Werte zwischen -110 und -50 mV verwendet. Die Zeitkonstanten wurden durch eine einfach-exponentielle Beschreibung der Deaktivierung unter Kontrollbedingungen und während Applikation von 200 nM TLTx1 bestimmt.

3.2.6 Inhibierung von Kv2.1(4.2 S3-S4)-Strömen durch TITx1

In den vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass TITx1 die Inaktivierung, die Deaktivierung und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2-Kanälen beeinflusst. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass es sich bei TITx1 um ein „gating-modifizierendes“ Peptid handelt. Ein bereits detailliert beschriebener „Gating-modifier“ für den Kv2.1-Kanal ist Hanatoxin (HaTx). Für dieses ebenfalls aus einer Tarantel stammende Toxin konnte eine Bindungsstelle in der Linkerregion zwischen den Segmenten 3 und 4 (S3-S4) nachgewiesen werden (Swartz und MacKinnon 1997). Davon ausgehend, dass eine Bindungsstelle für TITx1 an den Kv4.2-Kanal ebenfalls im S3-S4-Linker-Bereich liegt, wurde eine Chimäre aus dem Kv2.1-Kanal, welcher für die Wirkung von TITx1 nicht sensitiv war, und dem Kv4.2-Kanal konstruiert (s. Abb. 15). Dabei wurde die entsprechende Linker-Region des Kv2.1-Kanals durch den entsprechenden Teil des Kv4.2-Kanals ausgetauscht (Abb. 15 A). Diese Chimäre wurde transient in HEK 293-Zellen exprimiert und in Whole-Cell Patch-Clamp-Experimenten durch Membrandepolarisierungen von -100 nach 0 mV aktiviert.

Zugabe von 200 nM TITx1 führte zu einer Reduktion der Peakamplitude der Chimäre um $24,2 \pm 3,9$ % im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Abb. 15 A, C), welche nahezu vollständig reversibel war (Abb. 15 B). Die gleiche Konzentration von TITx1 appliziert auf Kv4.2-Kanäle bewirkte eine Reduktion der Peakamplitude um $55,7 \pm 3,1$ % (Abb. 15 C) und zeigte keine Wirkung auf Kv2.1-vermittelte Ströme. Des Weiteren wurde die Wirkung des Toxins auf die Peakleitfähigkeit-Spannungs-Beziehung der Kv2.1(4.2 S3-S4)-vermittelten Ströme untersucht (Abb. 15 D). Eine leichte Verschiebung von $V_{1/2}$ zu positiveren Potentialen erwies sich als nicht signifikant ($p = 0,85$).

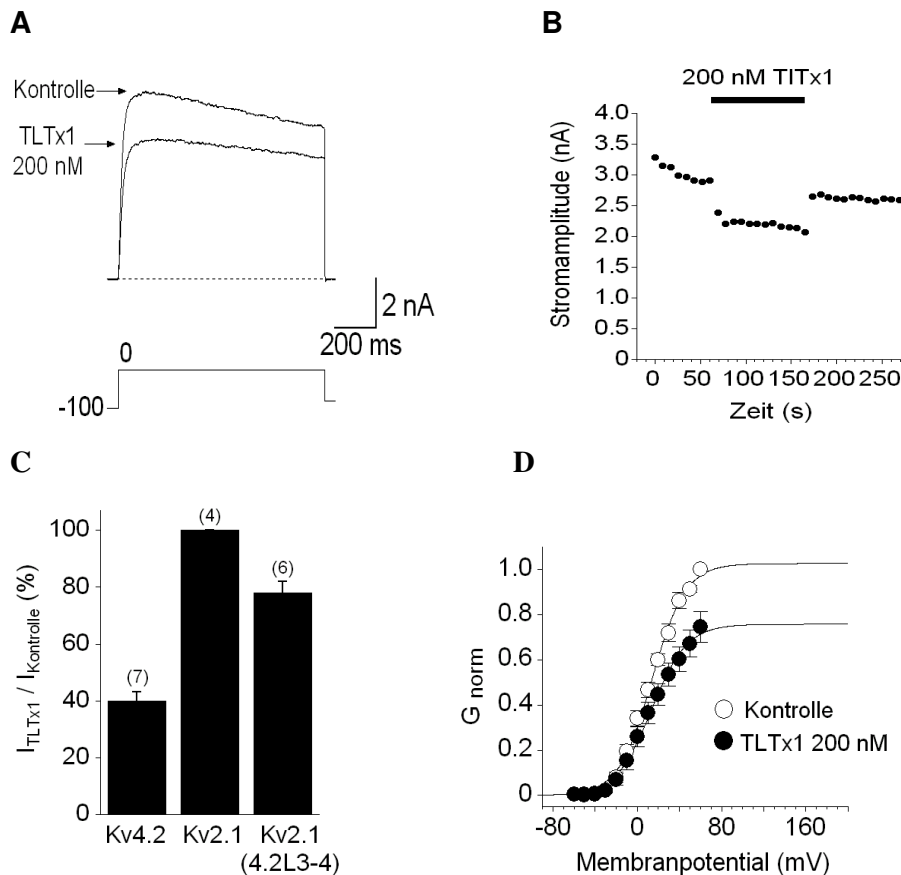


Abb. 15:

(A) Exemplarische Darstellung von Kv2.1(4.2 S3-S4)-Stromspuren gemessen an HEK-Zellen während Depolarisierung nach 0 mV unter Kontrollbedingungen und während Zugabe von 200 nM TITx1. Die zu jedem Zeitpunkt über der Zellmembran anliegende Spannung in mV ist unter den Stromspuren dargestellt. Als gestrichelte Linie ist die Nulllinie der Stromamplitude gekennzeichnet.

(B) Zeitabhängigkeit der Peakamplitudenreduktion während wiederholter Aktivierung (ca. 0,1 Hz) der Kv2.1(4.2 S3-S4)-vermittelten Ströme. Durch Applikation von 200 nM TITx1 wird die Peakamplitude auf ca. 78 % des Ausgangswertes reduziert. Erneute Applikation von Kontrolllösung führte annähernd zu einer Wiederherstellung der ursprünglichen Stromamplitude.

(C) Mittelwerte und Standardfehler der relativen Peakamplituden der durch Kv4.2, Kv2.1 und Kv2.1(4.2 S3-S4) vermittelten Ströme erhalten während Zugabe von 200 nM TITx1 verglichen mit den Kontrollbedingungen in Prozent. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in Klammern angegeben.

(D) Peakleitfähigkeit-Spannungs-Beziehung von Kv2.1(4.2 S3-S4)-vermittelten Strömen unter Kontrollbedingungen und während Applikation von 200 nM TITx1. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler normiert auf die maximale Peakleitfähigkeit unter Kontrollbedingungen ($n = 4$). Die Spannungsabhängigkeit der Werte konnte mit einer Boltzmann-Funktion ersten Grades beschrieben werden.

4 Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass das Gift der Vogelspinne *Theraphosa leblondi* selektiv Kv4-Kanal-vermittelte Ströme inhibiert. Aus dem Gift wurden drei Peptide isoliert (TITx1, TITx2 und TITx3). Für eines dieser Peptide (TITx1) konnte eine Wirkung auf den Kv4.2-Kanal nachgewiesen werden. Für die beiden anderen wird diese angenommen. Von allen drei Peptiden wurden die Aminosäuresequenzen bestimmt.

Die Wirkung von TITx1 auf durch den Kv4.2-Kanal vermittelte Ströme wurde genauer charakterisiert: Es zeigte sich, dass die Applikation des Toxins eine Veränderung der spannungsabhängigen Aktivierung, der Deaktivierung und außerdem der Inaktivierung des Kanals bewirkt. Die Veränderungen von Aktivierung und Inaktivierung konnten in ähnlicher, wenn auch quantitativ abweichender Form, bereits während der Applikation des Giftes beobachtet werden. Die Differenzen zwischen Gift- und Toxinwirkung sind möglicherweise durch unterschiedliche Aktivitäten und/ oder weitere noch nicht identifizierte, im Gift enthaltene, aktive Komponenten bedingt.

Durch Konstruktion einer Chimäre konnte gezeigt werden, dass bei der Bindung des Toxins an den Kanal die Linkerregion zwischen den Segmenten 3 und 4 (S3-S4) des Kanals eine wichtige Rolle spielt.

4.1 Bindungsstelle für TITx1 auf dem Kv4.2-Kanal

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind bereits eine große Anzahl an Peptidtoxinen mit Wirkung auf spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv) beschrieben. TITx1 gehört zur Gruppe der aus Spinnengiften isolierten Toxine, zu welcher außerdem Phrixotoxin, Heteropodatoxin, Hanatoxin, Stromatopelmatoxin und einige andere gehören (Swartz und MacKinnon 1995; Sanguinetti, Johnson et al. 1997; Diochot, Drici et al. 1999; Escoubas, Diochot et al. 2002). Diese Toxine zeigen die größte Affinität für Kv4- bzw. Kv2-Kanäle. Dies unterscheidet sie von der großen Gruppe von aus dem Gift von Skorpionen, Schlangen u.a. Tieren isolierten Toxine, welche vornehmlich an Shaker- bzw.

Kv1-Kanäle binden (Harvey und Anderson 1985; Goldstein und Miller 1993; Grissmer, Nguyen et al. 1994; Miller 1995; Shon, Stocker et al. 1998).

Da die aus 25 - 65 Aminosäuren bestehenden Peptidtoxine die Zellmembran nicht passieren können, wird ihre Bindungsstelle auf der dem Extrazellulärraum zugewandten Seite des Kanals angenommen. Als Bindungsstelle kommt entweder die Region zwischen den Segmenten 5 und 6 (S5-S6), die Porenregion, oder die dem Extrazellulärraum zugewandten Teile von S1 bis S4, welche Teil der Gating-Maschinerie sind, in Frage (Pongs 2000). Es ist außerdem möglich, dass ein oder mehrere Toxine gleichzeitig mit verschiedenen Teilen des Kanals interagieren.

Für viele Toxine, besonders solche mit Wirkung auf Shaker-verwandte bzw. Kv1-Kanäle, ist eine Bindungsstelle im Bereich der Porenregion nachgewiesen (Hurst, Busch et al. 1991; Stocker, Pongs et al. 1991; Park und Miller 1992; Park und Miller 1992; Goldstein, Pheasant et al. 1994; Aiyar, Withka et al. 1995; Scanlon, Naranjo et al. 1997) und das stöchiometrische Verhältnis der Bindung zwischen Kanalkomplex und Toxin beträgt 1:1 (Goldstein und Miller 1993; Gross und MacKinnon 1996).

Für Hanatoxin wurde eine wichtige Bindungsstelle zwischen den Segmenten 3 und 4 (S3-S4) des Kv2.1-Kanals nachgewiesen. Aber auch andere Teile des Kanals wie z.B. das Segment 5 (S5) spielen eine, wenn auch weniger entscheidende, Rolle bei der Toxinbindung (Swartz und MacKinnon 1997; Li-Smerin und Swartz 2000). In elektrophysiologischen Experimenten wurde gezeigt, dass die Bindung von Hanatoxin eine Änderung des kinetischen Verhaltens des Kanals hervorruft und ein stöchiometrisches Bindungsverhältnis von 4 Toxinmolekülen pro Kanal wurde nachgewiesen (Swartz und MacKinnon 1997).

Durch Konstruktion einer Chimäre aus den Kanälen Kv4.2 und Kv2.1 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass für die Bindung von TITx1 an den Kv4.2-Kanal die Region zwischen den Segmenten 3 und 4 (S3-S4) eine wichtige Rolle spielt: Ein Teil der TITx1-Sensitivität des Kv4.2-Kanals konnte durch Transfer des S3-S4-Linkers auf den Kv2.1-Kanal übertragen werden. TITx1 reduzierte den durch die konstruierte Kv2.1(4.2 S3-S4)-Chimäre

vermittelten Strom zwar zu einem geringeren Anteil als den durch den Kv4.2wt-Kanal vermittelten, aber dennoch signifikant im Vergleich zum insensitiven Kv2.1-Strom. Die im Vergleich zum Kv4.2wt abgeschwächte Wirkung könnte damit zu erklären sein, dass die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung der Chimäre im Vergleich zum Kv4.2wt zu negativeren Potentialen verschoben wird. (Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des Kv2.1(4.2 S3-S4)-Kanals war der des bereits beschriebenen humanen Kv2.1-Kanals sehr ähnlich (Zhu, Netzer et al. 1999)). Eine weitere mögliche Erklärung für die im Vergleich zum Kv4.2wt schwache Wirkung auf die Chimäre wäre, dass ein oder mehrere Toxinmoleküle gleichzeitig mit verschiedenen Teilen des Kv4.2-Kanals interagieren, wovon nicht alle in die Chimäre transferiert wurden.

Unter der Annahme einer 100%igen Aktivität wurde eine halbmaximale Wirkkonzentration für TITx1 auf durch den Kv4.2-Kanal vermittelte Ströme bei einer Depolarisierung der Zellmembran auf 0 mV von 193 nM ermittelt. Der Hill-Koeffizient für die Beschreibung der Konzentrations-Wirkungs-Abhängigkeit betrug 1,05. Für Phrixotoxin und Heteropodatoxin wurden halbmaximale Wirkkonzentrationen von 5-100 nM bei Applikation auf den Kv4.2-Kanal ermittelt (Diochot, Drici et al. 1999; Sanguinetti, Johnson et al. 1997) und für Stomatopelmatoxin, ein weiteres Spinnentoxin mit Aktivität auf den Kv4.2-Kanal, wurde ein ähnlicher Hill-Koeffizient wie der von TITx1 gefunden (Escoubas, Diochot et al. 2002).

Die Dosisabhängigkeit der Inhibition von durch den Kv2.1-Kanal vermittelten Strömen durch Hanatoxin wurde zunächst ebenfalls durch einen Hill-Koeffizienten von etwa 1 und einen Kd-Wert von 42 nM beschrieben (Swartz und MacKinnon 1995). Unter Berücksichtigung des besonderen Wirkungsmechanismus durch Bindung abseits der Porenregion entspricht der Anteil des inhibierten Stromes jedoch nicht unbedingt den toxingebundenen Kanälen, da das Bindungsverhältnis Toxin : Kanalkomplex nicht 1 : 1 beträgt. Daraus ergibt sich die Frage, wie viele Toxinmoleküle an den Kanal binden müssen, um den Stromfluss bei einem bestimmten Potential zu unterbinden. Da die Inhibition des Stromflusses bei einem bestimmten Potential durch eine Verschiebung der Aktivierung zu positiveren Potentialen bedingt ist, hängt die

Dosis-Wirkungs-Beziehung entscheidend von dem bei der Messung verwendeten Testpotential ab.

Eine erneut durchgeführte detaillierte Analyse der Dosisabhängigkeit der Bindung von Hanatoxin an den Kv2.1-Kanal ergab vier voneinander unabhängige Bindungsstellen, jede mit einem K_d -Wert von 102 nM (Swartz und MacKinnon 1997). Die Bindung von TITx1 an den Kv4.2-Kanalkomplex verhält sich möglicherweise analog zu der von Hanatoxin an den Kv2.1-Kanal.

Da sich die verschiedenen aus Spinnengiften isolierten Toxine mit Wirkung auf Kv-Kanäle, TITx1 eingeschlossen, in ihrer Aminosäuresequenz (s. Material und Methoden) und ihrer Wirkung auf das Gating des jeweiligen Kanals ähnlich sind, kann für sie ein Wirkmechanismus analog dem von Hanatoxin angenommen werden. Somit würden sie nicht direkt durch Okklusion der Pore im Sinne eines Porenblockers wirken, sondern durch Bindung im Bereich des Spannungssensor eine Veränderung der Kanalöffnungswahrscheinlichkeit bewirken.

4.2 TITx1 verändert das Gating des Kv4.2-Kanals

Die Hemmung des K^+ -Auswärtsstromes durch TITx1 ist besonders ausgeprägt bei schwacher Depolarisierung der Zellmembran und kann durch starke Depolarisierung z.T. überwunden werden. Diese spannungsabhängige Modulation der Aktivierung ist auch für die bereits beschriebenen Spinnentoxine mit Wirkung auf Kv4-Kanäle typisch (Sanguinetti, Johnson et al. 1997; Diochot, Drici et al. 1999; Escoubas, Diochot et al. 2002). Die Stromaktivierungskinetik wird verlangsamt bzw. zu positiveren Potentialen verschoben. Von den gemessenen Stromkinetiken ist jedoch nicht immer ein unmittelbarer Rückschluss auf das kinetische Verhalten des Kanals möglich. So könnte die Verlangsamung der Stromaktivierungskinetik darauf beruhen, dass das Toxin oder die Toxine zunächst den Kanal verlassen müssen bevor dieser öffnen kann, oder, was bei dem angenommenen Mechanismus wahrscheinlicher ist, dass das Toxin den geschlossenen Zustand des Kanals

stabilisiert und bei der Öffnung des Kanals durch starke Depolarisierung an diesen gebunden bleibt und seine Kinetik verändert.

Für Hanatoxin konnte gezeigt werden, dass es bei Öffnung des Kanals an diesen gebunden bleibt: Die Geschwindigkeit der Bindungsreaktion des Toxins mit dem Kanal wäre zu langsam, um durch Abdiffusion und erneute Bindung die beobachtete Veränderung der Deaktivierungskinetik hervorrufen zu können (Swartz und MacKinnon 1997). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Bewegung der geladenen Aminosäuren des Kanals, welche das Öffnen des Kanals bewirkt, zwar während der Applikation von Hanatoxin erst bei positiveren Potentialen stattfindet, das Toxin dabei jedoch gebunden bleibt (Lee, Wang et al. 2003).

Die Beobachtung, dass die Inaktivierungskinetik verlangsamt und die Deaktivierungskinetik beschleunigt wird, unterstützt im Falle der Bindung von TITx1 an den Kv4.2-Kanal die Hypothese, dass hier ein vergleichbarer Mechanismus Ursache für die beobachteten Veränderungen ist.

Bei Experimenten mit dem Kv4.2-Kanal konnte eine Beschleunigung der Deaktivierungskinetik nur gezeigt werden, wenn die ersten 40 Aminosäuren des Kanals entfernt wurden (Kv4.2 Δ 40), obwohl bei beiden Kanalvarianten die für eine halbmaximale Strominhibierung bei 0 mV nötige TITx1-Konzentration etwa gleich war. Dies zeigte, dass die beobachtbaren Veränderungen der Deaktivierungskinetik nicht alleine auf einem Nachlassen der Bindung des Toxins an den Kanal, sondern durch eine Modulation der Gating-Eigenschaften des Kanals durch andauernde Bindung des Toxins hervorgerufen werden müssen.

Es konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass der N-Terminus nicht nur bei der Inaktivierung, sondern auch bei der Deaktivierung des Kv4.2-Kanals eine wichtige Rolle spielt (Bähring, Dannenberg et al. 2001) (Gebauer, Isbrandt et al.). So führt eine Entfernung der ersten 40 Aminosäuren zu einer Stabilisierung des geöffneten Zustandes des Kanals, was in einer Verlangsamung der Deaktivierungskinetik resultiert. Eine mögliche Erklärung warum eine Beschleunigung der Deaktivierungskinetik durch TITx1 nur bei der Deletionsmutante, nicht aber beim Wildtyp beobachtet werden kann, ist dass eine weitere Beschleunigung der ohnehin schnellen Deaktivierung des Wildtyp-Kanals nicht möglich ist.

Die Wirkung der anderen derzeit bekannten Spinnentoxine mit Aktivität auf Kv4-Kanäle auf die Deaktivierungskinetik der Kanäle ist bisher nicht untersucht bzw. nicht publiziert. Da für diese Spinnentoxine ebenfalls keine Experimente bzgl. der Bindungsstelle, wie etwa Chimärenexperimente, durchgeführt wurden, ist TITx1 derzeit das einzige dieser Toxine, welches bzgl. des Wirkmechanismus genauer untersucht wurde. Wie an diesem Beispiel gezeigt, können gating-modifizierende Substanzen und der kombinierte Einsatz geeigneter Kanalmutanten bei der Erforschung der Deaktivierung und auch anderen Zustandsänderungen von Kanälen von großem Nutzen sein.

4.3 Anwendungsmöglichkeiten für TITx1

Es gibt eine ganze Reihe von Anwendungsmöglichkeiten für Peptidtoxine, welche spezifisch an bestimmte Ionenkanäle binden. So waren bei der Aufklärung der äußeren Porenregion von Shaker-Kaliumkanälen Agitoxin und Charybdotoxin bereits von großem Nutzen (Hidalgo und MacKinnon 1995; Naranjo und Miller 1996). Weitere Erkenntnisse die Kanalstruktur betreffend wurden jüngst durch die Röntgenstrukturanalyse kristallisierter K^+ -Kanal-Proteine gewonnen (Jiang, Lee et al. 2003; Jiang, Ruta et al. 2003). Neben der durch andere Methoden schon weit fortgeschrittenen Strukturaufklärung könnten gerade Gating-modifizierende Agentien sich bei der Aufklärung von Konformationsänderungen von Kanälen während des Gatings als wertvolle Hilfsmittel erweisen. So legen z.B. die Messungen der Deaktivierungskinetik der durch den Kv4.2wt-Kanal und durch die am N-Terminus gekürzte Mutante (Kv4.2 Δ 40) vermittelten Ströme die Vermutung nahe, dass der N-Terminus des Kanals nicht nur an der Inaktivierung des Kanals beteiligt ist, sondern außerdem die Deaktivierung verstärkt (Bähring, Boland et al. 2001). Die Tatsache, dass nur in Abwesenheit des N-Terminus eine signifikante Beschleunigung der Deaktivierungskinetik durch TITx1 messbar ist, untermauert diese Hypothese.

Da einige Spinnentoxine außerdem eine Verlangsamung der Inaktivierungskinetik der Ströme bewirken, könnten diese bei der

Untersuchung des Inaktivierungsmechanismus ebenfalls von großem Wert sein.

Es ist oft problematisch, die an bestimmten Zellen gemessenen Ströme einzelnen klonierten Kanälen zuzuordnen. Von den kinetischen Eigenschaften eines nativen Stromes auf die zugrundeliegenden molekularen Korrelate Rückschlüsse zu ziehen, ist in den meisten Fällen nicht möglich. So gibt es z.B. neben den Kv4-Kanälen als spannungsabhängige Kaliumkanäle noch weitere schnell inaktivierende Kv-Kanäle, wie den Kv1.4- und den Kv3.4-Kanal (Tseng-Crank, Tseng et al. 1990; Rettig, Wunder et al. 1992). Hinzu kommen noch die mannigfachen Möglichkeiten der Modulation der Kanaleigenschaften durch an sie bindende β -Untereinheiten (Scott, Rettig et al. 1994). So können z.B. einige eigentlich langsam inaktivierende Kv1-Kanäle durch eine derartige Interaktion ebenfalls zu schnell inaktivierenden Kanälen werden (Rettig, Heinemann et al. 1994). Daher ist die selektive Blockierung von durch bestimmte Kanäle vermittelten Strömen bei der Aufklärung ihrer Rolle an nativen Strömen von großem Wert. Für den Kv3.4-Kanal existieren mit BDS-1 und BDS-2 spezifische Inhibitoren (Diochot, Schweitz et al. 1998) und einige aus Spinnen stammende Toxine inkl. TITx1 haben sich als sehr spezifisch für die untereinander sehr ähnlichen Kv4-Kanäle erwiesen.

Die Spezifität der Spinnentoxine Phrixotoxin und Heteropodatoxin wurde bereits erfolgreich bei der Aufklärung der Rolle des Kv4.2-Kanals beim transienten Auswärtsstrom (I_{to}) im Myokard von Mäusen bzw. Ratten eingesetzt (Sanguinetti, Johnson et al. 1997; Diochot, Drici et al. 1999). Für das Gift von *Theraphosa leblondi* konnte eine Wirkung auf den A-Typ-Strom in hippocampalen Neuronen nachgewiesen werden. Die Rolle des Kv4.2 bzw. von Kv4-Kanälen in Neuronen des zentralen Nervensystems könnte u.U. durch ihre selektive Inhibierung weiter aufgeklärt werden.

Kaliumkanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Modulation der neuronalen Erregbarkeit (Pongs 1999) und Mutationen in Kaliumkanälen können daher zu epileptischen Phänotypen führen (Biervert, Schroeder et al. 1998; Smart, Lopantsev et al. 1998; Zuberi, Eunson et al. 1999).

Der Kv4.2-Kanal wird in den Körnerzellen des Gyrus Dentatus und in den Pyramidenzellen des Hippocampus stark exprimiert (Sheng, Tsaur et al. 1992; Tsaur, Sheng et al. 1992; Maletic-Savatic, Lenn et al. 1995; Serodio und Rudy 1998). Der hauptsächlich in den Dendriten vorhandene Kanal ist dort an der neuronalen Plastizität und der Langzeitpotenzierung (LTP) beteiligt. Entweder angeboren oder künstlich induziert kann es im Rattengehirn zu nodulären Heterotypien in hippocampalen Regionen kommen (Dubeau, Tampieri et al. 1995). In diesen heterotopen Zellen wird der Kv4.2-Kanal in erheblich geringerem Maße exprimiert als in den normalen umgebenden Zellen (Castro, Cooper et al. 2001) und es konnte eine erhöhte Neigung zu Krampfanfällen in Ratten mit diesen durch Methylazoxymethanol (MAM) induzierten Malformationen gezeigt werden (Baraban und Schwartzkroin 1996; Germano, Zhang et al. 1996; Germano und Sperber 1997). Bei Tieren mit diesen Malformationen können außerdem eine eingeschränkte LTP (Ramakers, Urban et al. 1993), eine erhöhte Erregbarkeit (Baraban und Schwartzkroin 1996) und die Fähigkeit, epileptiforme Entladungen zu generieren, (Baraban, Wenzel et al. 2000) beobachtet werden. Für corticale Regionen des Menschen konnte der Zusammenhang zwischen solchen Malformationen, der reduzierten Expression von Kv4.2-Kanälen und der Generierung von epileptischen Potentialen bisher allerdings nicht nachgewiesen werden.

Durch pharmakologische Beeinflussung der Kv4-Kanäle kann möglicherweise in der Zukunft die Rolle dieser Kanäle bei der Entstehung von bisher in ihrer genauen Pathogenese unklaren Krankheiten aufgeklärt werden.

5 Zusammenfassung

Spannungsaktivierte Kaliumkanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Membranspannung erregbarer Zellen. Der durch diese Ionenkanäle vermittelte Stromfluss kann durch Peptide, welche aus dem Gift von Tieren isoliert wurden, inhibiert werden. Einige der aus Spinnengiften isolierten Peptide zeigen dabei eine besonders hohe Affinität für die Subfamilie der Kv4-Kanäle.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des Giftes der Vogelspinne *Theraphosa leblondi* und eines daraus isolierten Peptids auf spannungsaktivierte Kaliumkanäle und im Besonderen auf den Kv4.2-Kanal untersucht. Dazu wurden zunächst in Neuronen vorkommende K⁺-Ströme und dann Ströme durch transient in embryonalen Nierenzellen (HEK 293) exprimierte Kv-Kanäle mit der Patch-Clamp-Technik in der Whole-Cell-Konfiguration gemessen. Die Applikation des Giftes bewirkte eine selektive Inhibierung der neuronalen A-Typ-Strom-Komponente. Aus dem Gift wurden in einem weiteren Schritt drei Peptide isoliert (TITx1, TITx2 und TITx3). Für eines dieser Peptide (TITx1) konnte eine Wirkung auf den Kv4.2-Kanal nachgewiesen werden. In weiteren elektrophysiologischen Experimenten wurde die Wirkung von TITx1 auf durch den Kv4.2-Kanal vermittelte Ströme genauer charakterisiert. Es zeigte sich, dass die Applikation des Toxins eine Veränderung der spannungsabhängigen Aktivierung, der Deaktivierung und außerdem der Inaktivierung des Kanals bewirkt. Die Veränderungen von Aktivierung und Inaktivierung konnten in ähnlicher, wenn auch quantitativ abweichender Form, bereits während Applikation des Giftes beobachtet werden. Durch Konstruktion einer Chimäre aus dem für TITx1 insensitiven Kv2.1-Kanal und dem TITx1-sensitiven Kv4.2-Kanal konnte gezeigt werden, dass bei der Bindung des Toxins an den Kv4.2-Kanal die Linkerregion zwischen den Segmenten 3 und 4 (S3-S4) des Kanals eine wichtige Rolle spielt. Die Wirkung von TITx1 auf die Gating-Parameter und dort insbesondere auf die Deaktivierungskinetik des Kv4.2-Kanals zusammen mit den Ergebnissen aus den Chimärenexperimenten führten zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei TITx1 um ein gating-modifizierendes Peptid handelt.

6 Literaturverzeichnis

Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits zuvor publiziert:

Ebbinghaus, J., Legros, C., et al. (2004). "Modulation of Kv4.2 channels by a peptide isolated from the venom of the giant bird-eating tarantula *Theraphosa leblondi*." *Toxicon* **43**(8): 923-32.

Aidley, D., Stanfield, P. (1996) *Ion Channels - Molecules in Action*.
Cambridge University Press, Cambridge

Aiyar, J., Withka, J. M., et al. (1995). "Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins." *Neuron* **15**(5): 1169-81.

Alonso, G. and Widmer, H. (1997). "Clustering of KV4.2 potassium channels in postsynaptic membrane of rat supraoptic neurons: an ultrastructural study." *Neuroscience* **77**(3): 617-21.

Bahring, R., Boland, L. M., et al. (2001). "Kinetic analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A-type potassium channels." *J Physiol* **535**(Pt 1): 65-81.

Bahring, R., Dannenberg, J., et al. (2001). "Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating." *J Biol Chem* **276**(26): 23888-94.

Baraban, S. C. and Schwartzkroin, P. A. (1996). "Flurothyl seizure susceptibility in rats following prenatal methylazoxymethanol treatment." *Epilepsy Res* **23**(3): 189-94.

Baraban, S. C., Wenzel, H. J., et al. (2000). "Characterization of heterotopic cell clusters in the hippocampus of rats exposed to methylazoxymethanol in utero." *Epilepsy Res* **39**(2): 87-102.

Bauer, C. K., Meyerhof, W., et al. (1990). "An inward-rectifying K⁺ current in clonal rat pituitary cells and its modulation by thyrotrophin-releasing hormone." *J Physiol* **429**: 169-89.

Bertrand, D., Bertrand, S., et al. (1992). "Pharmacological properties of the homomeric alpha 7 receptor." *Neurosci Lett* **146**(1): 87-90.

- Biervert, C., Schroeder, B. C., et al. (1998). "A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy." *Science* **279**(5349): 403-6.
- Castro, P. A., Cooper, E. C., et al. (2001). "Hippocampal heterotopia lack functional Kv4.2 potassium channels in the methylazoxymethanol model of cortical malformations and epilepsy." *J Neurosci* **21**(17): 6626-34.
- Cestele, S., Qu, Y., et al. (1998). "Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II." *Neuron* **21**(4): 919-31.
- Chalfie, M., Tu, Y., et al. (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." *Science* **263**(5148): 802-5.
- Chandy, K. G. (1991). "Simplified gene nomenclature." *Nature* **352**(6330): 26.
- Chandy, K. G. and Gutman, G. A. (1993). "Nomenclature for mammalian potassium channel genes." *Trends Pharmacol Sci* **14**(12): 434.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." *Mol Cell Biol* **7**(8): 2745-52.
- Choi, K. L., Aldrich, R. W., et al. (1991). "Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(12): 5092-5.
- Connor, J. A. and Stevens, C. F. (1971). "Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata." *J Physiol* **213**(1): 21-30.
- Covarrubias, M., Wei, A. A., et al. (1991). "Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K⁺ current systems." *Neuron* **7**(5): 763-73.
- Diochot, S., Drici, M. D., et al. (1999). "Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of Ito1 in cardiac electrogenesis." *Br J Pharmacol* **126**(1): 251-63.
- Diochot, S., Schweitz, H., et al. (1998). "Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4." *J Biol Chem* **273**(12): 6744-9.
- Dubeau, F., Tampieri, D., et al. (1995). "Periventricular and subcortical nodular heterotopia. A study of 33 patients." *Brain* **118 (Pt 5)**: 1273-87.

- Dubinsky, J. M. and Oxford, G. S. (1984). "Ionic currents in two strains of rat anterior pituitary tumor cells." *J Gen Physiol* **83**(3): 309-39.
- Durell, S. R. and Guy, H. R. (1992). "Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels." *Biophys J* **62**(1): 238-47; discussion 247-50.
- Escoubas, P., Diochot, S., et al. (2002). "Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies." *Mol Pharmacol* **62**(1): 48-57.
- Escoubas, P., Diochot, S., et al. (2000). "Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins." *Biochimie* **82**(9-10): 893-907.
- Faivre, J. F., Calmels, T. P., et al. (1999). "Characterisation of Kv4.3 in HEK293 cells: comparison with the rat ventricular transient outward potassium current." *Cardiovasc Res* **41**(1): 188-99.
- Fiset, C., Clark, R. B., et al. (1997). "Shal-type channels contribute to the Ca²⁺-independent transient outward K⁺ current in rat ventricle." *J Physiol* **500** (Pt 1): 51-64.
- Fleckenstein, A. (1985). "Calcium antagonism in heart and vascular smooth muscle." *Med Res Rev* **5**(4): 395-425.
- Frech, G. C., VanDongen, A. M., et al. (1989). "A novel potassium channel with delayed rectifier properties isolated from rat brain by expression cloning." *Nature* **340**(6235): 642-5.
- Gebauer, M., Isbrandt, D., et al. (2004). "N-type inactivation features of Kv4.2 channel gating." *Biophys J* **86**(1 Pt 1): 210-23.
- Germano, I. M. and Sperber, E. F. (1997). "Increased seizure susceptibility in adult rats with neuronal migration disorders." *Brain Res* **777**(1-2): 219-22.
- Germano, I. M., Zhang, Y. F., et al. (1996). "Neuronal migration disorders increase susceptibility to hyperthermia-induced seizures in developing rats." *Epilepsia* **37**(9): 902-10.
- Goldstein, S. A. and Miller, C. (1993). "Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K⁺ channel." *Biophys J* **65**(4): 1613-9.
- Goldstein, S. A., Pheasant, D. J., et al. (1994). "The charybdotoxin receptor of a Shaker K⁺ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition." *Neuron* **12**(6): 1377-88.

- Grissmer, S., Nguyen, A. N., et al. (1994). "Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines." *Mol Pharmacol* **45**(6): 1227-34.
- Gross, A., Abramson, T., et al. (1994). "Transfer of the scorpion toxin receptor to an insensitive potassium channel." *Neuron* **13**(4): 961-6.
- Gross, A. and MacKinnon, R. (1996). "Agitoxin footprinting the shaker potassium channel pore." *Neuron* **16**(2): 399-406.
- Hamill, O. P., Marty, A., et al. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflugers Arch* **391**(2): 85-100.
- Hartmann, H. A., Kirsch, G. E., et al. (1991). "Exchange of conduction pathways between two related K⁺ channels." *Science* **251**(4996): 942-4.
- Harvey, A. L. and Anderson, A. J. (1985). "Dendrotoxins: snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release." *Pharmacol Ther* **31**(1-2): 33-55.
- Hidalgo, P. and MacKinnon, R. (1995). "Revealing the architecture of a K⁺ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor." *Science* **268**(5208): 307-10.
- Hille, B. (1966). "Common mode of action of three agents that decrease the transient change in sodium permeability in nerves." *Nature* **210**(42): 1220-2.
- Hille, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*. Third Edition, Sinauer, Sunderland
- Hockerman, G. H., Peterson, B. Z., et al. (1997). "Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 361-96.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952). "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve." *J Physiol* **117**(4): 500-44.
- Hoffman, D. A., Magee, J. C., et al. (1997). "K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons." *Nature* **387**(6636): 869-75.

- Hoshi, T., Zagotta, W. N., et al. (1990). "Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation." *Science* **250**(4980): 533-8.
- Hurst, R. S., Busch, A. E., et al. (1991). "Identification of amino acid residues involved in dendrotoxin block of rat voltage-dependent potassium channels." *Mol Pharmacol* **40**(4): 572-6.
- Isacoff, E. Y., Jan, Y. N., et al. (1990). "Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes." *Nature* **345**(6275): 530-4.
- Isbister, G. K. and Gray, M. R. (2002). "A prospective study of 750 definite spider bites, with expert spider identification." *Qjm* **95**(11): 723-31.
- Isbister, G. K., Seymour, J. E., et al. (2003). "Bites by spiders of the family Theraphosidae in humans and canines." *Toxicon* **41**(4): 519-24.
- Jacobson, B. S. and Branton, D. (1977). "Plasma membrane: rapid isolation and exposure of the cytoplasmic surface by use of positively charged beads." *Science* **195**(4275): 302-4.
- Jiang, B., Sun, X., et al. (2002). "Endogenous Kv channels in human embryonic kidney (HEK-293) cells." *Mol Cell Biochem* **238**(1-2): 69-79.
- Jiang, Y., Lee, A., et al. (2003). "X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel." *Nature* **423**(6935): 33-41.
- Jiang, Y., Ruta, V., et al. (2003). "The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel." *Nature* **423**(6935): 42-8.
- Johnston, D., Hoffman, D. A., et al. (2000). "Dendritic potassium channels in hippocampal pyramidal neurons." *J Physiol* **525 Pt 1**: 75-81.
- Kalman, K., Nguyen, A., et al. (1998). "Genomic organization, chromosomal localization, tissue distribution, and biophysical characterization of a novel mammalian Shaker-related voltage-gated potassium channel, Kv1.7." *J Biol Chem* **273**(10): 5851-7.
- Kamb, A., Iverson, L. E., et al. (1987). "Molecular characterization of Shaker, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel." *Cell* **50**(3): 405-13.
- Lampe, R. A., Defeo, P. A., et al. (1993). "Isolation and pharmacological characterization of omega-gammatoxin SIA, a novel peptide inhibitor

- of neuronal voltage-sensitive calcium channel responses." *Mol Pharmacol* **44**(2): 451-60.
- Lang, D. G. and Ritchie, A. K. (1987). "Large and small conductance calcium-activated potassium channels in the GH3 anterior pituitary cell line." *Pflugers Arch* **410**(6): 614-22.
- Larsson, H. P., Baker, O. S., et al. (1996). "Transmembrane movement of the shaker K⁺ channel S4." *Neuron* **16**(2): 387-97.
- Lee, H. C., Wang, J. M., et al. (2003). "Interaction between extracellular Hanatoxin and the resting conformation of the voltage-sensor paddle in Kv channels." *Neuron* **40**(3): 527-36.
- Li, M., Jan, Y. N., et al. (1992). "Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel." *Science* **257**(5074): 1225-30.
- Lindl, T. (2000) *Zell- und Gewebekultur*. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Li-Smerin, Y., Hackos, D. H., et al. (2000). "alpha-helical structural elements within the voltage-sensing domains of a K(+) channel." *J Gen Physiol* **115**(1): 33-50.
- Li-Smerin, Y. and Swartz, K. J. (1998). "Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltage-gated Ca²⁺ and K⁺ channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8585-9.
- Li-Smerin, Y. and Swartz, K. J. (2000). "Localization and molecular determinants of the Hanatoxin receptors on the voltage-sensing domains of a K(+) channel." *J Gen Physiol* **115**(6): 673-84.
- Lüllmann, H., Mohr, K. (1999) *Pharmakologie und Toxikologie*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- MacKinnon, R. (1991). "Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel." *Nature* **350**(6315): 232-5.
- Maletic-Savatic, M., Lenn, N. J., et al. (1995). "Differential spatiotemporal expression of K⁺ channel polypeptides in rat hippocampal neurons developing in situ and in vitro." *J Neurosci* **15**(5 Pt 2): 3840-51.
- Matko, J. (2003). "K⁺ channels and T-cell synapses: the molecular background for efficient immunomodulation is shaping up." *Trends Pharmacol Sci* **24**(8): 385-9.

- Matteson, D. R. and Swenson, R. P., Jr. (1986). "External monovalent cations that impede the closing of K channels." *J Gen Physiol* **87**(5): 795-816.
- McDonough, S. I., Lampe, R. A., et al. (1997). "Voltage-dependent inhibition of N- and P-type calcium channels by the peptide toxin omega-grammotoxin-SIA." *Mol Pharmacol* **52**(6): 1095-104.
- McDonough, S. I., Mintz, I. M., et al. (1997). "Alteration of P-type calcium channel gating by the spider toxin omega-Aga-IVA." *Biophys J* **72**(5): 2117-28.
- Middleton, R. E., Warren, V. A., et al. (2002). "Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels." *Biochemistry* **41**(50): 14734-47.
- Miller, C. (1995). "The charybdotoxin family of K⁺ channel-blocking peptides." *Neuron* **15**(1): 5-10.
- Miller, C. (2000). "An overview of the potassium channel family." *Genome Biol* **1**(4): REVIEWS0004.
- Narahashi, T., Moore, J. W., et al. (1964). "Tetrodotoxin Blockage of Sodium Conductance Increase in Lobster Giant Axons." *J Gen Physiol* **47**: 965-74.
- Naranjo, D. and Miller, C. (1996). "A strongly interacting pair of residues on the contact surface of charybdotoxin and a Shaker K⁺ channel." *Neuron* **16**(1): 123-30.
- Nerbonne, J. M. (2000). "Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium." *J Physiol* **525 Pt 2**: 285-98.
- Neuhoff, H., Roeper, J., et al. (1999). "Activity-dependent formation of perforated synapses in cultured hippocampal neurons." *Eur J Neurosci* **11**(12): 4241-50.
- Numberger, M., Draguhn, A. (1996) *Patch-Clamp Technik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Ohya, S., Tanaka, M., et al. (1997). "Molecular cloning and tissue distribution of an alternatively spliced variant of an A-type K⁺ channel alpha-subunit, Kv4.3 in the rat." *FEBS Lett* **420**(1): 47-53.

- Pak, M. D., Baker, K., et al. (1991). "mShal, a subfamily of A-type K⁺ channel cloned from mammalian brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(10): 4386-90.
- Papazian, D. M., Timpe, L. C., et al. (1991). "Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence." *Nature* **349**(6307): 305-10.
- Parcej, D. N., Scott, V. E., et al. (1992). "Oligomeric properties of alpha-dendrotoxin-sensitive potassium ion channels purified from bovine brain." *Biochemistry* **31**(45): 11084-8.
- Park, C. S. and Miller, C. (1992). "Interaction of charybdotoxin with permeant ions inside the pore of a K⁺ channel." *Neuron* **9**(2): 307-13.
- Park, C. S. and Miller, C. (1992). "Mapping function to structure in a channel-blocking peptide: electrostatic mutants of charybdotoxin." *Biochemistry* **31**(34): 7749-55.
- Pelhate, M., Hue, B., et al. (1974). "[Modifications by 4 amino-pyridine of electric characteristics of the isolated giant axon of an insect, the cockroach (*Periplaneta americana* L.).]" *C R Seances Soc Biol Fil* **168**(1): 27-34.
- Pelhate, M. and Pichon, Y. (1974). "Proceedings: Selective inhibition of potassium current in the giant axon of the cockroach." *J Physiol* **242**(2): 90P-91P.
- Pongs, O. (1999). "Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement." *FEBS Lett* **452**(1-2): 31-5.
- Pongs, O., Kecskemethy, N., et al. (1988). "Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*." *Embo J* **7**(4): 1087-96.
- Pongs, O., Legros, C. (2000). *Pharmacology of Voltage-Gated Potassium Channels. Pharmacology of Ionic Channel Function: Activators and Inhibitors. (Handbook of Experimental Pharmacology)*. M. Endo, Kurachi, Y., Mishina, M., Springer Verlag. Vol. 147: pp 177-196.
- Ramakers, G. M., Urban, I. J., et al. (1993). "The impaired long-term potentiation in the CA1 field of the hippocampus of cognitive deficient microencephalic rats is restored by D-serine." *Neuroscience* **54**(1): 49-60.

- Reid, P. F., Pongs, O., et al. (1992). "Cloning of a bovine voltage-gated K⁺ channel gene utilising partial amino acid sequence of a dendrotoxin-binding protein from brain cortex." *FEBS Lett* **302**(1): 31-4.
- Reimann, F. and Ashcroft, F. M. (1999). "Inwardly rectifying potassium channels." *Curr Opin Cell Biol* **11**(4): 503-8.
- Rettig, J., Heinemann, S. H., et al. (1994). "Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit." *Nature* **369**(6478): 289-94.
- Rettig, J., Wunder, F., et al. (1992). "Characterization of a Shaw-related potassium channel family in rat brain." *Embo J* **11**(7): 2473-86.
- Rolf, S., Haverkamp, W., et al. (2000). "Effects of antiarrhythmic drugs on cloned cardiac voltage-gated potassium channels expressed in *Xenopus oocytes*." *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **362**(1): 22-31.
- Sah, P. (1996). "Ca²⁺-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation." *Trends Neurosci* **19**(4): 150-4.
- Sala, S. and Matteson, D. R. (1991). "Voltage-dependent slowing of K channel closing kinetics by Rb⁺." *J Gen Physiol* **98**(3): 535-54.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press,
- Sanguinetti, M. C., Johnson, J. H., et al. (1997). "Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels." *Mol Pharmacol* **51**(3): 491-8.
- Scanlon, M. J., Naranjo, D., et al. (1997). "Solution structure and proposed binding mechanism of a novel potassium channel toxin kappa-conotoxin PVIIA." *Structure* **5**(12): 1585-97.
- Scott, V. E., Rettig, J., et al. (1994). "Primary structure of a beta subunit of alpha-dendrotoxin-sensitive K⁺ channels from bovine brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(5): 1637-41.
- Serodio, P. and Rudy, B. (1998). "Differential expression of Kv4 K⁺ channel subunits mediating subthreshold transient K⁺ (A-type) currents in rat brain." *J Neurophysiol* **79**(2): 1081-91.

- Sewing, S., Roeper, J., et al. (1996). "Kv beta 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits." *Neuron* **16**(2): 455-63.
- Shen, N. V. and Pfaffinger, P. J. (1995). "Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K⁺ channel subunit proteins." *Neuron* **14**(3): 625-33.
- Sheng, M., Tsaur, M. L., et al. (1992). "Subcellular segregation of two A-type K⁺ channel proteins in rat central neurons." *Neuron* **9**(2): 271-84.
- Shon, K. J., Stocker, M., et al. (1998). "kappa-Conotoxin PVIIA is a peptide inhibiting the shaker K⁺ channel." *J Biol Chem* **273**(1): 33-8.
- Sidach, S. S. and Mintz, I. M. (2002). "Kurtoxin, a gating modifier of neuronal high- and low-threshold Ca channels." *J Neurosci* **22**(6): 2023-34.
- Silbernagel, S., Despopoulos, A. (1991) *Taschenatlas der Physiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Smart, S. L., Lopantsev, V., et al. (1998). "Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice." *Neuron* **20**(4): 809-19.
- Stocker, M., Pongs, O., et al. (1991). "Swapping of functional domains in voltage-gated K⁺ channels." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **245**(1313): 101-7.
- Swartz, K. J. and MacKinnon, R. (1995). "An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula." *Neuron* **15**(4): 941-9.
- Swartz, K. J. and MacKinnon, R. (1997). "Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K⁺ channel through multiple binding sites." *Neuron* **18**(4): 665-73.
- Swartz, K. J. and MacKinnon, R. (1997). "Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltage-dependent K⁺ channels." *Neuron* **18**(4): 675-82.
- Talukder, G. and Harrison, N. L. (1995). "On the mechanism of modulation of transient outward current in cultured rat hippocampal neurons by di- and trivalent cations." *J Neurophysiol* **73**(1): 73-9.
- Tasaki, I. and Hagiwar, A. S. (1957). "Demonstration of two stable potential states in the squid giant axon under tetraethylammonium chloride." *J Gen Physiol* **40**(6): 859-85.

- Tempel, B. L., Papazian, D. M., et al. (1987). "Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*." *Science* **237**(4816): 770-5.
- Terlau, H., Shon, K. J., et al. (1996). "Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail." *Nature* **381**(6578): 148-51.
- Timpe, L. C., Schwarz, T. L., et al. (1988). "Expression of functional potassium channels from Shaker cDNA in *Xenopus* oocytes." *Nature* **331**(6152): 143-5.
- Tsaur, M. L., Sheng, M., et al. (1992). "Differential expression of K⁺ channel mRNAs in the rat brain and down-regulation in the hippocampus following seizures." *Neuron* **8**(6): 1055-67.
- Tseng-Crank, J. C., Tseng, G. N., et al. (1990). "Molecular cloning and functional expression of a potassium channel cDNA isolated from a rat cardiac library." *FEBS Lett* **268**(1): 63-8.
- Valmier, J., Richard, S., et al. (1991). "Dihydropyridines interact with calcium-independent potassium currents in embryonic mammalian sensory neurons." *Pflugers Arch* **419**(3-4): 281-7.
- Van Wagoner, D. R., Pond, A. L., et al. (1997). "Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation." *Circ Res* **80**(6): 772-81.
- Wang, H., Shi, H., et al. (2000). "Nicotine is a potent blocker of the cardiac A-type K(+) channels. Effects on cloned Kv4.3 channels and native transient outward current." *Circulation* **102**(10): 1165-71.
- Weidmann, H. and Petersen, P. V. (1955). "The local anesthetic action of a series of diamino propionic acid anilides." *J Pharmacol Exp Ther* **115**(2): 246-50.
- Winterfield, J. R. and Swartz, K. J. (2000). "A hot spot for the interaction of gating modifier toxins with voltage-dependent ion channels." *J Gen Physiol* **116**(5): 637-44.
- Wulff, H., Beeton, C., et al. (2003). "Potassium channels as therapeutic targets for autoimmune disorders." *Curr Opin Drug Discov Devel* **6**(5): 640-7.
- Yellen, G. (1998). "The moving parts of voltage-gated ion channels." *Q Rev Biophys* **31**(3): 239-95.

- Yeola, S. W. and Snyders, D. J. (1997). "Electrophysiological and pharmacological correspondence between Kv4.2 current and rat cardiac transient outward current." *Cardiovasc Res* **33**(3): 540-7.
- Yool, A. J. and Schwarz, T. L. (1991). "Alteration of ionic selectivity of a K⁺ channel by mutation of the H5 region." *Nature* **349**(6311): 700-4.
- Yu, W., Xu, J., et al. (1996). "NAB domain is essential for the subunit assembly of both alpha-alpha and alpha-beta complexes of shaker-like potassium channels." *Neuron* **16**(2): 441-53.
- Yuste, R. (1997). "Potassium channels. Dendritic shock absorbers." *Nature* **387**(6636): 851, 853.
- Zhang, G., Gurtu, V., et al. (1996). "An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells." *Biochem Biophys Res Commun* **227**(3): 707-11.
- Zhou, M., Morais-Cabral, J. H., et al. (2001). "Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors." *Nature* **411**(6838): 657-61.
- Zhu, X. R., Netzer, R., et al. (1999). "Structural and functional characterization of Kv6.2 a new gamma-subunit of voltage-gated potassium channel." *Receptors Channels* **6**(5): 337-50.
- Zhu, X. R., Wulf, A., et al. (1999). "Characterization of human Kv4.2 mediating a rapidly-inactivating transient voltage-sensitive K⁺ current." *Receptors Channels* **6**(5): 387-400.
- Zuberi, S. M., Eunson, L. H., et al. (1999). "A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with partial epilepsy." *Brain* **122** (Pt 5): 817-25.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

A	Amplitude
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
C	Kapazität, Coulomb
CaCl ₂	Calciumchlorid
CO ₂	Kohlendioxid
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Potential
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EPSP	Excitatory Postsynaptic Potential
F	Farad
G	Leitfähigkeit, Giga
h	Hill-Koeffizient
HCl	Salzsäure
HEK 293	Human embryonic kidney
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HPLC	High pressure liquid chromatography
Hz	Hertz
H ₂ O	Wasser
I	Strom
IC ₅₀	halbmaximal inhibierende Konzentration
K ⁺	Kalium
k	Steigungsfaktor, Kilo
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
Konz.	Konzentration
Kv	Spannungsabhängiger Kaliumkanal

l	Liter
LTP	Langzeitpotenzierung
M	Molar, Mega
m	Milli
MAM	Methylazoxymethanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
Mr	Molekulare Masse
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
OD	Optische Dichte
Ω	Ohm
R	Widerstand
Rb ⁺	Rubidium
s	Sekunden
Std.	Stunden
T	absolute Temperatur
t	Zeit
TEA	Tetraethylammonium
TTX	Tetrodotoxin
τ	Zeitkonstante
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolett
V	Spannung, Volt
V _{1/2}	Potential der halbmaximalen Aktivierung
wt	Wildtyp
Zn	Zink
ZNS	zentrales Nervensystem
4-AP	4-Aminopyridin

7.2 Lebenslauf

Name: Jan Ebbinghaus
Geburtsdatum: 05.11.1976
Geburtsort: Bremen

Schulische Ausbildung:

1983-1987: Grundschule an der Freiligrathstrasse, Bremen
1987-1993: Gymnasium an der Julius-Brecht-Allee, Bremen
1993-1994: High-School in Clinton, TN (USA) mit Abschluss
1994-1996: Altes Gymnasium Bremen mit Abiturabschluss

Zivildienst:

1996-1997: Rettungsdienst beim Malteser-Hilfsdienst in Bremen

Studium:

1997-1998: Studium der Physik an der Universität Hamburg
1998-2004: Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

Seit 2001: Doktorand am Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg (ZMNH), Institut für Neurale Signalverarbeitung, unter der Leitung von Professor Dr. Olaf Pongs.

7.3 Danksagung

Prof. Dr. Olaf Pongs danke ich für die Gelegenheit, in einem technisch optimal ausgestatteten Labor arbeiten zu dürfen. Die Betreuung meiner Doktorarbeit durch Prof. Pongs und seine Mitarbeiter empfand ich als vorbildlich.

Dr. Christian Legros danke ich für die Aufreinigung und Bereitstellung des Spinnengiftes und für die Initiierung dieses Projektes.

Dr. Robert Bähring danke ich für die engagierte Betreuung und die Korrektur dieser Arbeit. Seine Geduld, ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen wertvollen Hilfen haben entscheidend zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Britta Callsen, Andreas Nolting, Iris Meier, Sabine Wehrmann, Andrea Zaiser und ganz besonders Manuel Gebauer danke ich für die geduldige Einführung in die verschiedenen Arbeitstechniken und die vielen hilfreichen Ratschläge.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Neurale Signalverarbeitung, die mit großer Hilfsbereitschaft und einem hervorragenden Arbeitsklima dafür gesorgt haben, dass mir die Arbeit viel Freude bereitet hat.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Freunden, die immer von großer Bedeutung waren und sein werden.

7.4 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe, Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Jan Ebbinghaus