Aus dem Institut für Neurale Signalverarbeitung

des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg

des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Professor Dr. O. Pongs

# Identifikation charakteristischer Bindungsstrukturen zwischen den T-lymphozytären Kaliumkanälen Kv1.1, Kv1.3 und $SK_{Ca}2$ und Kanalliganden anhand von Chimären des prokaryotischen Kaliumkanals KcsA

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Florian Albers

aus Hamburg

Hamburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 15.04.2005

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. O. Pongs

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. F. Nolte

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. P. Friederich

.....

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| µ | mikro ($10^{-6}$) |
| $^{125}$I | $^{125}$Jod ($^{125}$Iodine) |
| $^{125}$I-HgTX$_1$-(A19Y/Y37F) | $^{125}$Monojodtyrosin-Hongotoxin 1-(A19Y/Y37F) |
| $^{125}$I-KTX | $^{125}$Monojodtyrosin-Kaliotoxin |
| A | Adenin |
| amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumpersulfat-Puffer |
| AS | Aminosäure(n) |
| b | Basen |
| $BK_{Ca}$ | hochkonduktiver kalziumaktivierter Kaliumkanal |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| C | Cytosin |
| Chi | Chimäre |
| Ci | Curie |
| cpm | Zählimpulse pro Minute (counts per minute) |
| Da | Dalton |
| DM | n-Decyl-β-D-Maltopyranoside |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | 2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| $EC_{50}$ | effektive Konzentration 50% |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz |
| EtOH | Ethanol |
| FPLC | schnelle Protein-Säulenchromatographie (fast protein liquid chromatography) |
| g | Gramm |

| | |
|---|---|
| G | Guanosin |
| h | Stunde |
| $HgTX_1$ | Hongotoxin 1 |
| I | Inosin |
| $IC_{50}$ | Hemmkonzentration 50% |
| $IK_{Ca}$ | mittelkonduktiver kalziumaktivierter Kaliumkanal |
| IPTG | Isopropyl-β-D-Thiogalactosid |
| J | Joule |
| k | kilo ($10^3$) |
| kb | Kilobasenpaare |
| $K_d$ | Gleichgewichtsdissoziationskonstante |
| $K_i$ | Gleichgewichtsinhibitionskonstante |
| $k_{ob}$ | observierte Gleichgewichtsassoziationsrate |
| $k_{off}$ | Gleichgewichtsdissoziationsrate |
| $k_{on}$ | Gleichgewichtsassoziationsrate |
| KTX | Kaliotoxin |
| Kv | spannungsgesteuerter Kaliumkanal |
| l | Liter |
| LB | Luria Bertani |
| m | milli ($10^{-3}$) |
| M | Molar |
| mA | Milliampere |
| min | Minute |
| n | nano ($10^{-9}$) |
| $Ni^{2+}$-NTA | Nickel-Nitrotriacetylsäure |
| nm | Nanometer |
| OD | optische Dichte |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Natriumphosphat-Puffer (phosphate buffered saline) |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction) |

| | |
|---|---|
| PEG | Polyethylenglykol |
| PET | Polyethylentoluol |
| Pfu | Pyrococcus furiosus |
| pfu | Einzelplaque bildende Einheit (plaque forming unit) |
| PMSF | Proteaseinhibitor (Phenyl-Methylsulfonlyfluorid) |
| pS | Picosiemens |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RT | Raumtemperatur |
| s/ sek | Sekunde |
| SB | Superbroth |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate) |
| $SK_{Ca}$ | niederkonduktiver kalziumaktivierter Kaliumkanal |
| Std. | Stunde |
| SV | Säulenvolumina |
| T | Thymin |
| Taq | Thermophilius aquaticus |
| TB | terrific broth |
| TE | Tris EDTA-Puffer |
| $T_m$ | Schmelztemperatur |
| Tris | Tris-hydroxymethyl-aminomethan |
| U | Enzymeinheit (Units) |
| ü.N. | über Nacht |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | ultraviolettes Licht |
| V | Volt |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| vol | Volumen |
| w/v | Gewicht pro Volumen (weight/ volume) |
| x g | relative Erdbeschleunigung |
| Xgal | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid |

Ein-Buchstaben-Symbole der Aminosäuren

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| A | Alanin | C | Cystein | D | Aspartat |
| E | Glutamat | F | Phenylalanin | G | Glycin |
| H | Histidin | I | Isoleucin | K | Lysin |
| L | Leucin | M | Methionin | N | Asparagin |
| P | Prolin | Q | Glutamin | R | Arginin |
| S | Serin | T | Threonin | V | Valin |
| W | Tryptophan | Y | Tyrosin | | |

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....i
Inhaltsverzeichnis..... I
I Arbeitshypothese und Fragestellung.....1
II Einleitung.....2
1. Kaliumkanäle: Definition und Struktur.....2
1.1 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Kv).....3
1.2 Kalziumaktivierte Kaliumkanäle ($SK_{Ca}$).....4
2. Ionenkanäle im Immunsystem als Angriffspunkte der Immunsuppression.....4
2.1 T-Zellaktivierung.....5
3. Kv1.3, Kv1.1 und $Sk_{Ca}2$ exprimiert auf T-Zellen als Ziel der Immunsuppression.....6
4. Expression von Kaliumkanal-Chimären als die molekularen Angriffspunkte.....7
5. Identifikation von charakteristischen Bindungsstrukturen.....8
5.1 Bindungsassays.....8
5.2 Phage-Display.....10
III Material.....11
1. Chemikalien und Gebrauchmaterialien.....11
IV Methoden.....12
1. Molekularbiologische Methoden.....12
1.1 Handhabung von Bakterienstämmen.....12
1.2 Präparation von DNA.....13
1.3 Mikrodialyse von DNA.....15
1.4 Enzymatische Modifikationen von DNA.....15
1.5 Agarosegelelektrophorese von DNA.....16
1.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....17
1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA durch Extinktionsmessung.....17
1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....18
1.9 Sequenzierung von DNA.....20
2. Proteinbiochemische Methoden.....21

2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese....21
2.2 Photometrische Quantifikation von Protein....21
2.3 Western Blot-Analyse....22
2.4 Expression in *Escherichia coli*....23
2.5 Lyse von Bakterien....24
2.6 Proteinextraktion und –immobilisation auf NiNTA-Agarosepartikeln....25
2.7 Konzentration und Entsalzung von Proteinen....26
2.8 Pharmakologische Charakterisierung von Kanalproteinen....27
3. Computergestützte Bindungs- & Sequenzanalysen....30
V Ergebnisse....31
1. Chimären und Proteinexpression:....31
1.1 Benutzte KcsA-Chimären aus den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen Kv1.1 und Kv1.3....31
1.2 Geplante KcsA-Chimären aus dem kalziumaktivierten, niederkonduktiven Kaliumkanal $SK_{Ca}2$ : KcsA-Ska, KcsA-Skb, KcsA-Ska-F103L, KcsA-Skb-F103L....32
2. Kanalproteinexpression....35
2.1 Wachstumskontrolle von KcsA-Ska und KcsA-Skb....35
2.2 Expression und Elution der Chimäre IV in pQE32 und pQE70 sowie des Wildtyp KcsA-Kanals in pQE32....38
2.3 Elutionsprofile und SDS-Page der aufgereinigten Proteine....40
3. Screening der Phagen-Peptidbibliothek gegen Chimäre IV und Wildtyp-KcsA in drei Selektionsrunden....43
4. Bindungsassays....47
4.1 Kompetitive Bindungsexperimente....47
4.2 Dissoziationsrate $k_{off}$ für HgTX von Bakterienmembranen mit Chimäre VIII und Chimäre VIII-G56T....52
4.3 Assoziationsrate $k_{on}$ für HgTX von Bakterienmembranen mit Chimäre VIII und Chimäre VIII-G56T....53
4.4 Dissoziationsrate $k_{off}$ für $^{125}$I-$HgTX_1$ von Liposomen mit Chimäre IV....54
VI Diskussion....55
1. Chimären der niederkonduktiven kalziumabhängigen Kaliumkanäle $SK_{Ca}$....55
1.2 Klonierungsprodukte von rSK2 als KcsA-Ska und KcsA-Skb....56

1.3 Rolle der Mutation an Position F103L .....57
2. Identifikation charakteristischer Bindungsstellen zwischen Kanaltoxinen und Chimären der Kanäle Kv1.x in KcsA. .....59
2.1 Bindungsstellen zwischen Hongotoxin 1 ($HgTX_1$) bzw. Kaliotoxin (KTX) und KcsA-Kv1 Chimären in der Subregion III der Porenregion .....60
2.2 Bindungsstellen zwischen Hongotoxin 1 ($HgTX_1$) bzw. Kaliotoxin (KTX) und KcsA-Chimären in der Subregion I .....66
2.3 Veränderung des Bindungsverhaltens von Chimäre IV in Liposomen .....69
2.4 Auswertung von Bindungsexperimenten .....69
3. Aussichten der Strukturaufklärung und Charakterisierung von Kaliumkanälen und Liganden. .....71
VII Zusammenfassung .....73
VIII Literaturverzeichnis .....74
IX Anhang .....83
1. Lösungen und Puffer .....83
2. Nährmedien .....89
3. Bakterienstämme .....90
4. Molekulargewichtstandards .....90
5. Vektoren .....91
6. Antikörper und Histidin-Komplexbildner .....91
7. Kanalprotein-Liganden .....92
8. Oligonukleotide .....92
9. Kontrollwachstum von E.coli $XL_1$blue .....93
10. Vektoren .....94
Danksagung .....95
Lebenslauf .....96
Erklärung .....97

# I Arbeitshypothese und Fragestellung

Ziel der Arbeit ist es, Chimären des prokaryotischen Kaliumkanals KcsA aus dem Bakterium *Streptomyces lividans* mit Substitutionen der eukaryotischen, auf T-Lymphozyten vorkommenden, Kaliumkanäle Kv1.1, Kv1.3 und $SK_{Ca}2$ in der Porenregion bzw. der Region zwischen den transmembranären Segmenten S5 und S6 zu klonieren und in Bakterienmembranen zu exprimieren. Des Weiteren sollen mit den Chimären für entsprechende Kaliumkanal-Liganden wichtige Bindungsstrukturen bzw. Aminosäuren in Kv1.1, Kv1.3 und $SK_{Ca}2$ in Bindungsassays identifiziert und charakterisiert werden. Als Kaliumkanal-Liganden dienen hierbei aus Tiergiften isolierte und rekombinant hergestellte Kanaltoxine. Im Detail ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Lässt sich die Subregion I der S5/S6-Region von rSK2 bzw. Teile davon als KcsA-Ska und KcsA-Skb in KcsA klonieren und die Chimäre exprimieren? Sind die Kanalchimären isoliert außerhalb der Bakterienmembran als Tetramer stabil?
2. Welche Rolle spielt eine Mutation an Position F103L bezüglich der Expression und Stabilität des tetrameren Kanals?
3. Wie verändert sich das Bindungsverhalten der Skorpiongifte Hongotoxin ($HgTX_1$) und Kaliotoxin (KTX) als Kanalliganden des Kv1.1- und Kv1.3-Kanals gegenüber Substitutionen in der Subregion III der Porenregion von KcsA an Positionen 81 (KcsA-Kv1.1-L81M) bzw. 81 und 82 (KcsA-Kv1.3-L81M/Y82H Chimäre VIII), und welche Rolle spielen diese Positionen im Rahmen der Bindung?
4. Wie verändert sich das Bindungsverhalten der Skorpiongifte Hongotoxin ($HgTX_1$) und Kaliotoxin (KTX) als Kanalliganden der KcsA-Kv1.3-Chimäre VIII gegenüber einer Substitution G56T in der Subregion I der Porenkanzelregion, und welche Rolle spielt diese Substitution?
5. Wie wird das Bindungsverhalten der Chimäre IV als Protein in Liposomenmembranen beeinflusst?
6. Welche Probleme ergeben sich in Bindungsversuchen, deren Auswertung und Interpretation?
7. Welches sind die Aussichten der Strukturaufklärung und Charakterisierung von Kaliumkanälen und Liganden?

# II Einleitung

## 1. Kaliumkanäle: Definition und Struktur

Kaliumkanäle sind nahezu ubiquitär in erregbaren und nicht erregbaren Zellen verteilt [87]. Als eine heterogene Gruppe von integralen Membranproteinen sind sie durch unterschiedliche elektrophysiologische und pharmakologische Eigenschaften charakterisiert [11]. Sie sind beteiligt an der Weiterleitung und Modulation von Aktionspotentialen und an der Aufrechterhaltung des Membranpotentials. So beeinflussen sie viele physiologische Prozesse wie die Freisetzung von Neurotransmittern, elektrophysiologische Eigenschaften von Herzmuskel- und Erregungsleitungszellen sowie Stoffwechsel- und Sekretionsleistungen unerregbarer Zellen [38], bei denen das Membranpotential zur Regulation der Signaltransduktion eine Rolle spielt [61].

Die große Familie der Kaliumkanäle wird nach der Zahl der Transmembranbereiche (S) und der Porenregion (P) in verschiedene Strukturklassen unterteilt. Die beiden in dieser Arbeit untersuchten Kanalklassen der spannungsgesteuerten Kv-Kanäle und kalziumaktivierten niederkonduktiven SK-Kanäle gehören zur Klasse der 6S/1P-Kanäle (Abb. 1a) [100,44,80]. Durch Klonierung vieler Kaliumkanäle konnte gezeigt werden, dass die Kanalpore aus vier flankierenden $\alpha$-Untereinheiten (Abb 1a) mit jeweils den zuvor genannten 6 transmembranären Domänen S1-S6 und einer porenbildenden Einheit zwischen S5 und S6 gebildet wird (Abb. 1b) [65]. Die tetramere Architektur und die Struktur der Porenregion konnte in Kristallstrukturanalysen aufgeklärt werden [19]. Die P-Domäne enthält eine konservative Aminosäuresequenz (TXG[Y/F]G), genannt Signatursequenz, in der C-terminalen Hälfte, die die Kaliumselektivität vermittelt [35] (T= Threonin; X= Leucin/ Valin/ Isoleucin; G= Glycin; Y= Tyrosin; F= Phenylalanin).

## 1.1 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Kv)

Neun Familien spannungsgesteuerter Kaliumkanäle wurden bis jetzt beschrieben [86]. Die aus Drosophila melanogaster klonierten Kanäle *Shaker*, *Shab*, *Shaw* und *Shal* zeigen sich zu auf Säugerzellen befindlichen Kv1, Kv2, Kv3 und Kv4 homolog [47,1]. Viele dieser Kaliumkanäle sind auf Grund ihrer physiologischen Rolle in Zellmembranen und pathophysiologischen Eigenschaften im Rahmen von Erkrankungen gut charakterisiert [14].

In spannungsgesteuerten Kaliumkanälen weist das Transmembransegment S4 eine regelmäßige Abfolge positiv geladener Aminosäurereste auf, die als Spannungssensor fungiert [10]. Die positiv geladenen Aminosäuren (K oder R) befinden sich an jeder dritten Position, jeweils durch zwei hydrophobe Aminosäuren getrennt, es ergibt sich für Kv-Kanäle eine konservative Struktur $(R/K\text{-}X\text{-}X)_n$ mit X als beliebig hydrophobe Aminosäure und n als Zahl zwischen vier und sieben [78]. Bei Depolarisation der Membran über einen für den Kanal charakteristischen Wert induziert der Spannungssensor die Öffnung des Kanals [74,55].

Die Diversität einiger spannungsgesteuerter und kalziumaktivierter (II.1.2) Kaliumkanäle beruht u.a. auf der Fähigkeit verschiedener α-Untereinheiten Heteromultimere zu bilden [41,88,14]. Die Interaktion der Kv-α-Untereinheiten wird durch eine zytoplasmatische Tetramerisierungsdomäne 1 ($T1_{A,\ B}$) vermittelt, die aminoterminal lokalisiert ist [63,94].

Schnelle inaktivierende A-Typ-Kv-Kanäle vom *Shaker*-Typ können eine Inaktivierungsdomäne im N-terminalen Bereich aufweisen, die nach dem „ball and chain“- Mechanismus die zytoplasmatische Porenseite kurz nach der Öffnung verschließt [3]. Neben dieser N-Typ-Inaktivierung ist auch eine C-Typ-Inaktivierung bekannt, die sich an C-terminalen Aminosäuren der P-Domäne und des 6. Transmembransegmentes (S6) abspielt [102,32]. Mit den Kv-α-Untereinheiten sind zytoplasmatische Kv-β-Untereinheiten vergesellschaftet, die eine ebenso große Vielfalt aufweisen. Sie binden die aminoterminale Domäne und weisen einen ähnlichen Inaktivierungsmechanismus auf, wie die N-Typ-Inaktivierung. Somit kann ihre Co-Expression drastisch das Inaktivierungsverhalten der Kv-α-Untereinheiten verändern [79,67].

## 1.2 Kalziumaktivierte Kaliumkanäle ($SK_{Ca}$)

Kalziumaktivierte Kaliumkanäle haben die Abhängigkeit von der intrazellulären Kalziumkonzentration als Initialisierungsfaktor zur Kanalöffnung gemeinsam. Sie werden auf Grund ihrer Einzelkanalleitfähigkeitseigenschaften (in Picosiemens, pS) eingeteilt in SK-Kanäle (small conductance, 2- 25 pS), IK-Kanäle (intermediate conductance, 25- 100 pS) und BK- oder maxi-K-Kanäle (large conductance, 100- 300 pS) [47].

Kalziumgesteuerte Kaliumkanäle weisen einen ähnlichen Aufbau aus vier α-Untereinheiten auf, wie die Kv-Kanäle, allerdings haben die α-Untereinheiten der kalziumabhängigen Kaliumkanäle $BK_{Ca}$ eine zusätzliche transmembranäre Domäne, S0, am N-terminalen Teil. Bei SK-Kaliumkanälen spielt die Bindung des intrazellulären Kalziums an Calmodulin und die Bindung dieses Komplexes an den zytoplasmatischen C-Terminus der S6-Domäne in der Aktivierung zur Öffnung eine große Rolle [50,20]. Während die BK-Kanäle sowohl spannungs- als auch kalziumabhängig aktiviert werden, sind IK- und SK-Kanäle spannungsunabhängig [1].

# 2. Ionenkanäle im Immunsystem als Angriffspunkte der Immunsuppression

Die Gruppe der Kaliumkanäle weist eine große funktionelle und strukturelle Vielfalt auf. Die Möglichkeit der Kaliumkanäle, Heteromultimere aus unterschiedlichen α-Untereinheiten zu bilden [37,51], sowie der Einfluss anderer fakultativ vergesellschafteter Untereinheiten auf die Kanäle [79] potenziert diese Vielfalt um ein Mehrfaches. Durch die Strukturaufklärung der Kaliumkanäle lassen sich spezifische Inhibitoren einzelner Kanaltypen entdecken und entwickeln. Aufgrund der zellspezifischen Verteiung der unterschiedlichen Kaliumkanäle lässt sich durch Inhibition eines spezifischen Kanaltyps die Zellaktivität eines Organsystems selektiv beeinflussen [34,59].

In den Zellen des Immunsystems gibt es verschiedene Kanalproteine, über deren Inhibition durch Kanalblocker eine Suppression des Immunsystems stattfinden kann. In

der therapeutischen Immunsuppression nach z.B. Organtransplantation bietet sich die T-Zelle mit ihrer spezifischen Ionenkanal-Struktur als geeignetes Ziel an [15].
Nach Entdeckung und Identifikation eines Kv-Kaliumkanals auf ruhenden T-Zellen [17,7] wurden auch andere Kanäle auf T-Lymphozyten entdeckt [8]. Neben den Kaliumkanälen spielen auch Chloridkanäle [77] sowie Kalziumkanäle selbst eine Rolle [81]. Unter den Kaliumkanälen sind die spannungsgesteuerten Kv-Kanäle Kv1.3 [72,52] und Kv3.1 [6,30], vorwiegend auf $CD8^+$-Suppressor- und zytotoxischen T-Zellen gefunden worden [1]. Die Expression von Kv1.1 ist auf unreifen $CD4^-CD8^-$-Thymozyten entdeckt worden [23].
Unter den kalziumgesteuerten Kaliumkanälen spielt vor allen Dingen der IK-Kanal $hIK_{Ca}1$ bei der T-Zell-Proliferation eine übergeordnete Rolle für den Aktivitätserhalt der T-Zelle [29,45,21]. Als ein auf Apamin, einem Bienengift, sensitiver Kanal ließ sich der SK-Kanal SK2 auf Jurkat-Zellen, einer humanen leukämischen T-Zellline, identifizieren [43]. Über die Präsenz von SK2-Kanälen auf menschlichen T-Zellen ist ebenfalls berichtet worden, wenn ihre Rolle auch noch unklar ist. Wahrscheinlich sind sie an einer Kalium-Hintergrundleitfähigkeit beteiligt oder formen Heteromultimere mit anderen $K_{Ca}$-α-Untereinheiten [1].

## 2.1 T-Zellaktivierung

Eines der frühzeitigen Ereignisse in der T-Zellaktivierung ist die Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels, die letztendlich zur Produktion von Zytokinen und zur Zellproliferation führt [62]. Zu den Ereignissen vor der Kalziumausschüttung im Rahmen der T-Zellaktivierung gehören: Nach Bindung an den T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex kommt es zur Aktivierung einer Tyrokinase, die ihrerseits die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Die PLC spaltet aus Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ($PIP_2$) Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat ($IP_3$) ab. $IP_3$ verursacht die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern, während DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, die ihrerseits über das ras-Gen die Transkription ankurbelt und selbst Kv-Kanäle phosphoryliert. Mit einer gleichzeitigen Depolarisation der Zellmembran öffnen sich Kv-Kanäle, und $K^+$-Ionen fließen aus der Zelle, was den

Einstrom von weiteren $Ca^{2+}$-Ionen zur Folge hat. Durch die Erhöhung des intrazellulären Kalziums und die Bindung an Calmodulin wird die Phosphatase Calzineurin aktiviert. Sie ist der Angriffspunkt anderer Immunsuppressiva wie Cyclosporin A oder FK-506 (Tacrolimus), die Calzineurin inhibieren [98,73]. Calzineurin seinerseits dephosphoryliert einen zytoplasmatischen Transkriptionsfaktor [6]. Neben der Sekretion des Interleukin-2 wird auch im Rahmen der Proliferation die Expression weiterer Kv1.3- und $hIK_{Ca}1$-Kanäle stimuliert. Durch den erhöhten intrazellulären $Ca^{2+}$-Spiegel öffnen sich auch die kalziumgesteuerten Kaliumkanäle $hIK_{Ca}1$ und kalziumabhängige Kalziumkanäle CRAC, über die die Feinabstimmung weiteren Kalziumeinstroms und somit eine Modulation der Immunantwort stattfindet [29]. Ein funktioneller Unterschied zwischen dem spannungsgesteuerten Kv1.3-Kanal und dem kalziumaktivierten $hIK_{Ca}1$-Kanal besteht darin, dass Kv1.3 in der Initiation zur Proliferation der T-Zelle eine unerlässliche Rolle spielt, während $hIK_{Ca}1$-Kanäle anschließend den aktivierten Zustand der T-Zelle aufrecht erhalten [9].
Kaliumkanäle haben somit einen bedeutenden, wenn auch indirekten, Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration, indem sie durch den Austritt aus der Zelle das Membranpotential erniedrigen und somit die treibende Kraft für den Kalziumeintritt liefern [62].

## 3. Kv1.3, Kv1.1 und $Sk_{Ca}2$ exprimiert auf T-Zellen als Ziel der Immunsuppression

Während Kv1.3 zusammen mit $IK_{Ca}$-Kanälen auf normalen proliferierenden humanen T-Zellen eine hohe Expressionsrate aufweisen, zeigt sich eine Expression von $SK_{Ca}$-Kanälen auf humanen leukämischen Jurkat-T-Zellen, die bei Zellaktivierung sogar heruntergeregelt wird [18]. Jurkat-T-Zellen werden vorwiegend in in vitro Versuchen mit T-Lymphozyten verwendet, da ihre Proliferation gut zu steuern ist und sie T-Lymphozyten phänotypisch annäherend entsprechen. Sie exprimieren wie normale T-Lymphozyten Kv1.3-Kanäle, aber an Stelle von $hIK_{Ca}1$-Kanälen exprimieren sie niederkonduktive $SK_{Ca}2$-Kanäle. Die $SK_{Ca}2$-Kanäle übernehmen auf Jurkat-Zellen die funktionelle Rolle von $hIK_{Ca}1$-Kanälen auf normalen T-Zellen [9]. Jurkat-T-Zellen

haben als leukämische Zellen ihre Proliferationssteuerung teilweise verloren, weshalb die Expression von $SK_{Ca}$-Kanälen bei Zellaktivierung sogar heruntergeregelt wird [18].
Kv1.1 hingegen wird zusammen mit Kv1.3 vorwiegend auf unreifen $CD4^-CD8^-$ Thymozyten exprimiert, während auf reifen $CD4^+CD8^-$ und $CD4^-CD8^+$ Lymphozyten hauptsächlich Kv1.3 zu finden ist. Beide Kanäle scheinen eine wichtige Bedeutung in der frühen Entwicklung und Proliferation von Thymozyten inne zu haben [23]. Kv1.3 eignet sich somit als Angriffspunkt einer Immunsuppression von reifen proliferierenden T-Lymphozyten. Durch eine Hemmung von Kv1.1 Kaliumkanälen ließe sich die Reifung unreifer Thymozyten hemmen, während $SK_{Ca}2$-Kanäle gehäuft auf Lymphozyten der leukämischen T-Zell-Linie Jurkat anzutreffen sind.

## 4. Expression von Kaliumkanal-Chimären als die molekularen Angriffspunkte

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Porenregion zwischen einem bakteriellen Kaliumkanal KcsA und Kv-Kanälen [66] lassen sich charakteristische Bindungsstrukturen der Kanalrezeptor-Liganden-Interaktion des eukaryotischen Kanals in KcsA-Kv-Chimären untersuchen. Die Rezeptor-Liganden-Interaktion lässt sich in Bindungsassays mit den isolierten Kanalchimären und Skorpiontoxinen als Liganden näher charakterisieren [57].
KcsA stammt aus *Streptomyces lividans* und hat im Vergleich zu eukaryotischen Kv-Kanälen nur 2 transmembranäre Regionen [93]. Er ist somit kleiner, hat aber mit ebenfalls tetramerer Struktur eine zu eukaryotischen Kv-Kanälen homologe Porenregion [104]. Strukturelle Untersuchungen konnten zeigten, dass KcsA und Kv-Kanäle eine austauschbare Porenregion aufweisen [46,89,13].
Peptidliganden isoliert aus verschiedenen Tiergiften, aber auch einige synthetische Liganden inhibieren manche Kaliumkanäle, indem sie an die äußere Porenregion der Kanäle binden und diese verschließen (Abb 1b). Für die aus Skorpiongiften isolierten Toxine Kaliotoxin (KTX) aus *Androctonus mauretanicus* und Hongotoxin 1 ($HgTX_1$) aus *Centruroides limbatus* konnte für bestimmte Kv-Kanäle eine Blockierung der Kanalpore festgestellt werden [47]. Ebenso zeigten sich Bindungen zwischen aus

Bienengift isoliertem Apamin und $SK_{Ca}2$ [31]. Mit Hilfe strukturell definierter Toxine konnten so Aufschlüsse über die Struktur der äußeren Porenregion verschiedener Kv-Kanäle erhalten werden [25].
In dieser Arbeit sollen Unterregionen der Kaliumkanäle Kv1.1, Kv1.3 und $SK_{Ca}2$ in die Porenregion des KcsA substituiert werden und durch Einführung einzelner Punktmutationen für die Bindung mit Liganden charakteristischen Aminosäuren identifiziert werden [58,103].

## 5. Identifikation von charakteristischen Bindungsstrukturen

### 5.1 Bindungsassays

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens zwischen den verschiedenen Kanalchimären und radioaktiv markierten Skorpiontoxinen als Liganden bieten sich Bindungassays an [24,85]. In homologen kompetitiven Bindungsassays werden Liganden und Kompetitoren benutzt, die die gleiche Affinität zum Rezeptor haben. In dieser Arbeit wurden mit $^{125}$I-markierte und unmarkierte Liganden benutzt. Im Falle von $HgTX_1$ wurde eine Doppelmutation $HgTX_1$-A19Y/Y37F eingeführt, um den Einfluss des Jod-Atoms auf die Bindungseigenschaften des Toxins zum Kanal möglichst gering zu halten [47]. Für die jodierten und unmarkierten Liganden konnte die gleiche Affinität zum Rezeptor festgestellt werden [53].
Anhand des Massenwirkungsgesetzes lassen sich verschiedene Konstanten in Rahmen von Bindungsassays ermitteln, die für einen Liganden und den Rezeptor spezifisch sind, und miteinander vergleichen. Auf diese Weise lässt sich eine Aussage über eine veränderte Affinität eines Liganden zu einem Rezeptor machen, der vielleicht an nur einer Aminosäure verändert wurde. So lässt sich feststellen, ob diese Aminosäure möglicherweise eine wesentliche Funktion in der Liganden-Rezeptor-Interaktion trägt.
Das Reaktionsgleichgewicht einer Bindungsreaktion ist erreicht, wenn die Rate neuer Liganden-Rezeptor-Komplexe gleich der Rate der Liganden-Rezeptor-Dissoziationen ist [69,70].

Aus dem Massenwirkungsgesetz ergeben sich folgende Definitionen und Zusammenhänge:

$K_d$: Gleichgewichtsdissoziationskonstante:

Konzentration von Liganden, bei der im Reaktionsgleichgewicht 50% der Rezeptoren besetzt sind, in Mol/l oder Molar. $K_d = k_{off} / k_{on}$.

In homologen Bindungsexperimenten, bei denen der markierte und unmarkierte Ligand die gleiche Affinität zum Rezeptor hat, gilt: $K_d = K_i = IC_{50}$- [Radioligand].

$K_i$: Gleichgewichtsinhibitionskonstante:

Konzentration unmarkierter Liganden, bei der 50% der Rezeptoren ohne Anwesenheit markierter oder anderer Kompetitoren besetzt sind, in Mol/l oder Molar. $K_i$ verhält sich proportional zur $IC_{50}$.

$k_{on}$: Gleichgewichtsassoziationsrate:

Anzahl von Bindungen pro Zeiteinheit, spezifisch für einen bestimmten Rezeptor und einen bestimmten Liganden, in $Molar^{-1}*min^{-1}$. Die Werte liegen meist um $10^{-8}$ $M^{-1}min^{-1}$.

$k_{on} = k_{ob} – k_{off}$/ [Radioligand]

$k_{ob}$: observierte Gleichgewichtsassoziationsrate:

Zeigt, wie schnell das Reaktionsgleichgewicht erreicht ist, in $Molar^{-1}*min^{-1}$. $k_{ob}$ verhält sich proportional zu $k_{on}$. $k_{ob}$ ist abhängig von $k_{on}$, $k_{off}$ und [Radioligand] (siehe $k_{on}$).

$k_{off}$: Gleichgewichtsdissoziationsrate:

Anzahl von Bindungslösungen pro Zeiteinheit eines bestimmten Liganden von einem bestimmten Rezeptor, in $min^{-1}$.

$IC_{50}$: Hemmkonzentration „inhibitory concentration“ 50%:

Molare Konzentration eines Kompetitors, bei der die spezifische Bindung eines Radioliganden um 50% reduziert wird.

$EC_{50}$: effektive Konzentration „effective concentration“ 50%:

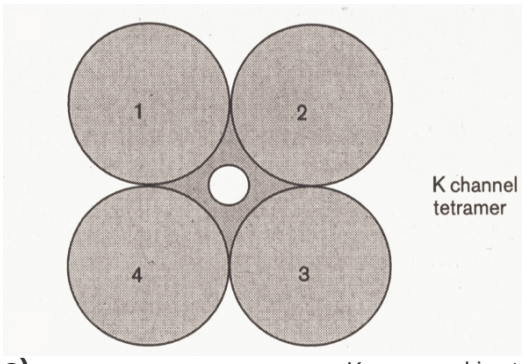
Molare Konzentration von Radioliganden, bei der sich 50% der maximalen Antwort zeigt.

## 5.2 Phage-Display

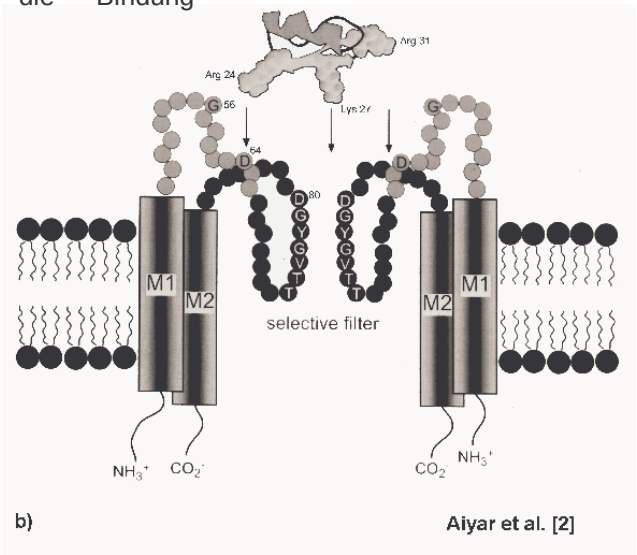
Eine weitere Möglichkeit der Identifikation charakteristischer Bindungsstrukturen der Kanalporenregion, bzw. Identifikation neuer Liganden, die die Aktivität des Kanals beeinflussen, bietet der Phage-Display [49].

Das Kanalprotein wird hierzu mit einer kommerziellen Phagenbibliothek inkubiert, die Phagen enthält, die sich nur durch eine Sequenz von sieben aufeinander folgenden Aminosäuren des Mantelproteins unterscheiden. In der Bibliothek sind alle Möglichkeiten der Kombination dieser Sequenz mehrfach vorhanden, um die Wahrscheinlichkeit der Bindung einer konsensuellen Sequenz an die Porenregion zu erhöhen. Um unspezifische Phagenbindung möglichst gering zu halten, wurde die Phagenbibliothek zuvor mit dem KcsA-Kanal inkubiert und der nicht gebundene Überstand zur weiteren Inkubation mit den Kanalchimären verwendet. Zur Elution bindender Phagen aus der Porenregion wurde dann Kanaltoxin verwendet.

Eine so identifizierte konsensuelle Proteinsequenz, die an die Porenregion bindet, könnte dann hinsichtlich ihrer Beeinflussung der Aktivität bzw. Ionendurchlässigkeit des Kaliumkanals elektrophysiologisch untersucht werden [28].




a) Kaczorowski et al.




b) Aiyar et al. [2]

**Abb. 1a+b: Schematische Darstellung der tetrameren Struktur spannungsgesteuerter Kv-Kanäle und einer Chimäre. a:** Kaliumkanal-Tetramer bestehend aus 4 Kv-α-Untereinheiten und der porenbildenden Region (Mitte). Es kann unter Umständen auch aus unterschiedlichen Untereinheiten geformt sein. **b:** Modell der Interaktion zwischen einem Kanaltoxin (hier KTX) und einer Chimäre von Kv1.3 im Bakterienkanal KcsA (Chimäre KcsA-Kv1.3). Dargestellt sind die transmembranären Regionen M1-2 zweier Untereinheiten, der Selektivitätsfilter mit der Signatursequenz und für die Bindung charakteristische Aminosäuren.

# III Material

## 1. Chemikalien und Gebrauchmaterialien

Falls nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien von den Firmen Baker, Difco, Fluka GibcoBRL, Macherey-Nagel, Merck, Riedel-de-Haen, Roth, Serva und Sigma-Aldrich in p.A.- oder Reinstqualität bezogen.
Enzyme, Molekulargewichtsstandards, Nukleosidtriphosphate und Antikörper wurden von den Firmen Bio-Rad, Boehringer Mannheim, Clontech, Invitrogen, New England Biolabs, Novagen, MBI Fermentas, Pharmacia Biotech, Promega, Qiagen, Stratagene, Sigma und USB erworben.
Oligonukleotide wurden von der Firma MWG erworben. Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang (IX.8).
Es wurden Kodak MR und MS Röntgenfilme verwendet.
Fertige Kanalproteine und Chimären-Plasmide wurden vom Labor Legros im Institut für Neurale Signalverarbeitung zur Verfügung gestellt. $^{125}$Jod- markierte und unmarkierte Toxine sowie Vektoren zu deren Expression wurden mit bestem Dank vom Labor Dr. H.-G. Knaus, Institut für Biochemische Pharmakologie, Universität Innsbruck und vom Labor Dr. M.L. Garcia, Department of Membrane Biochemistry and Biophysics, Merck Research Laboratories gestellt.

Eine Auflistung verwendeter Materialen und Chemikalien ist im Anhang (IX) zu finden.

# IV Methoden

## 1. Molekularbiologische Methoden

### 1.1 Handhabung von Bakterienstämmen

#### 1.1.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

[91]

Einer bei -70°C gelagerten Glycerin-Dauerkultur (in LB-Medium, 25% (v/v) Glycerin) des Bakterienstamms wurde ein Aliquot entnommen und auf einer LB-Platte mit dem geeigneten Antibiotikum ausgestrichen. Die Zellen wurden ü.N. bei 37°C kultiviert. Die Platten wurden anschließend bei 4°C bis zu 4 Wochen gelagert.

#### 1.1.2 Präparation kompetenter Bakterien

[40]

Von einer frischen Platte wurde 1 Kolonie *E. coli* XL1-*Blue*-Zellen gepickt und eine 10 ml ü.N. Kultur in SOB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angelegt. Es wurden 3x 100 ml SOB-Medium mit Antibiotika mit je 1 ml der ü.N. Kultur angeimpft und je 1 ml einer 2 M $Mg^{2+}$-Lösung zugegeben. Die Kultur wurde im Warmluftschüttler bei 180 Upm und 37°C inkubiert, bis sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600}$ = 0,34-0,45) befanden, das Wachstum wurde protokolliert. Anschließend wurden die Bakterien 10 min auf Eis abgekühlt, dann zentrifugiert (2500 × g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde vollständig abgenommen, die Pellets in je 30 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 40-60 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden erneut zentrifugiert (2500 × g, 4°C, 10 min), die Pellets in je 4 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und mit jeweils 300 µl DMSO zu einer Endkonzentration von 7% versetzt. Die Suspension wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zu 200 µl-Portionen aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Die Transformationseffizienz der Zellen wurde bestimmt, indem Transformationen mit definierten Mengen an Plasmid-DNA durchgeführt wurden.

### 1.1.3 Transformation von Bakterien

[91]

Zur Transformation der *E. coli*-Stämme XL1-*Blue*, ER2738 und M15pREP4 wurden 100 µl einer Suspension kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA (20-50 ng) oder einem Ligationsansatz (IV.1.4.5) 20 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock (90 s, 42°C) und Abkühlen auf Eis (5 min) wurden die Bakterienzellen auf LB/Amp-Platten (XL1-*Blue*, ER2738) bzw. auf LB/Amp/Kana-Platten (M15pREP4) ausplattiert und anschließend ü.N. bei 37°C kultiviert.

## 1.2 Präparation von DNA

### 1.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus 3-5 ml-Kulturen (Miniprep)

[5,82]

Die Anzucht des plasmidtragenden Bakterienstammes erfolgte aus einer Einzelkolonie in 3-5 ml SB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin ü.N. bei 37°C im Warmluftschüttler (180 Upm). Die Flüssigzellkultur wurde pelletiert (10000 x g, RT, 10 min) und das Bakteriensediment in 300 µl Zell-Resuspensionspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Zell-Lyse-Lösung wurde vorsichtig durchmischt, bis die Lyse der Bakterien durch Klarwerden der Lösung angezeigt wurde. Anschließend wurden 300 µl Neutralisations-Lösung zugegeben, durch mehrfache Inversion durchmischt und 5 min bei 10000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde die wässrige Phase abgenommen und auf eine zuvor mit 1 ml Wizard Miniprep DNA Purification Resin bestückte Wizard Miniprep Säule übertragen. Sämtliche Flüssigkeiten wurden auf einer Promega´s Vac-Man Apparatur durch die Säule gesogen. Die Säule wurde mit 2 ml Säulen-Waschlösung gewaschen und erneut unter Unterdruck kurz getrocknet. Auf einem neuen 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen wurde die Säule dann mit 50 µl Tris-HCl, pH 7,4, 1

min inkubiert und die DNA in einer Tischzentrifuge (10000 x g, 30 sek) aus der Säule eluiert.

### 1.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus 50 ml-Kulturen (Midiprep)

[64]

Die Präparation wurde mit dem ”Nucleobond®AX”-System von Macherey-Nagel durchgeführt.

50 ml LB/Amp-Medium wurden mit einer Einzelkolonie plasmidtragender *E. coli* XL 1 *Blue* Zellen von einer LB/Amp-Platte angeimpft und ü. N. bei 37°C im Warmluftschüttler (180 Upm) inkubiert.

Die Bakterienkultur wurde zentrifugiert (6000 × g, 4°C, 10 min) und das Pellet in 4 ml Puffer S1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer S2 wurde vorsichtig durch Invertieren gemischt und die Suspension 5 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde mit 4 ml Puffer S3 versetzt, vorsichtig durchmischt und 10 min auf Eis stehengelassen. Die ausgefällten Proteine wurden anschließend pelletiert (10000 × g, 4°C, 15 min) und der die Plasmide enthaltende Überstand über Filterpapier auf eine zuvor mit 2 ml Puffer N2 äquilibrierte Säule Nucleobond AX 100 gegeben. Die Säule wurde zweimal mit je 4 ml Puffer N3 gewaschen und danach die an die Säule gebundenen Plasmide mit 3 ml Puffer N5 eluiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Vol.% Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation (15000 × g, RT, 30 min) wurde das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in Tris-HCl, pH 7,4, aufgenommen. Die Ausbeute an DNA wurde photometrisch bestimmt (IV.1.8.1) und die Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt.

### 1.2.3 Präparation von Phagen-DNA

[71]

Jeweils 1 ml einer 1:100 Verdünnung einer E.coli ER2738 ü.N. Kultur wurde mit dem zu sequenzierenden Phagen-Plaque infiziert, im Warmluftschüttler (37°C, 175 Upm, 5h) inkubiert und anschließend in der Tischzentrifuge pelletiert (14000 Upm, 30 Sek). Der

Überstand wurde erneut pelletiert und 500 µl dieses Überstandes 10 min mit 200 µl PEG/ NaCl bei RT inkubiert. Anschließend wurde wieder zentrifugiert (14000 Upm, 10 min, RT) und das Pellet in 100 µl Jodit-Puffer resuspendiert. Zur Ausfällung der DNA wurden 250 µl 96% Ethanol zugefügt, wie gehabt zentrifugiert und das Pellet in 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde nach Trocknen in der Vakuumzentrifuge in 30 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, aufgenommen. Phagen-DNA wurde photometrisch quantifiziert (IV.1.7) und sequenziert (IV.1.9).

## 1.3 Mikrodialyse von DNA

Bis zu 50 µl eines DNA-haltigen Reaktionsansatzes wurden auf einen Mikrodialysefilter (Millipore, ∅ 13 mm, Porengröße 0,025 µm) pipettiert. Die Dialyse erfolgte gegen bidestilliertes Wasser (20-30 min).

## 1.4 Enzymatische Modifikationen von DNA

### 1.4.1 Restriktionsverdau von DNA

[91]

Eine bestimmte Menge DNA wurde zusammen mit der gewünschten Restriktionsendonuklease in einem nach Herstellerangaben für das Enzym geeignetem Restriktionspuffer und geeigneter Reaktionstemperatur für 1-2 h inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung (IV.1.5) oder mit dem GFX-DNA-Aufreinigungs-Kit, Amersham, (IV.1.6) gestoppt. Gleichzeitiger Verdau mit zwei Enzymen konnte nur bei Übereinstimmung der erforderlichen Reaktionsbedingungen der jeweiligen Enzyme stattfinden. War ein Parallelverdau Aufgrund der Pufferbedingungen nicht möglich, wurde sequentiell verdaut und zwischen den Restriktionen eine Mikrodialyse (IV.1.3) gegen $H_2O$ durchgeführt.

### 1.4.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

[91]

Um Religationen der durch Restriktionsendonukleasen liniarisierter Vektor-DNA während der Ligation zu verhindern, wurde die DNA dephosphoryliert.

Die zu dephosphorylierende DNA wurde mit alkalischer Phosphatase (1 U pro pmol 5'-Enden) in AP-Puffer 1h bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend mit dem GFX-DNA-Aufreinigungs-Kit, Amersham gereinigt (IV.1.6).

### 1.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten

[91]

Es wurden 20 ng Vektor-DNA mit einem dreifachen molaren Überschuss an Fragment-DNA in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl in Ligationspuffer mit 1 U T4-DNA-Ligase inkubiert. Für Ligationen von Fragmenten mit glatten Enden (*blunt end*) wurde mindestens 4 h ligiert, für Ligationen von Fragmenten mit überhängenden Enden (*sticky end*) betrug die Inkubationsdauer 1 h bei RT.

## 1.5 Agarosegelelektrophorese von DNA

[91]

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten (Ansätze mit DNA-Probenpuffer versetzt) erfolgte je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente in horizontalen Agarosegelen (1-2% (w/v) in TAE-Puffer) unter Verwendung von GNA-100 Elektrophoresekammern (Pharmacia Biotech). Als Laufpuffer diente TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid als Nachweisreagenz. Die angelegte Spannung variierte zwischen 70 und 100 V, die Trenndauer betrug 30-90 min.

## 1.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

[76]

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem Amersham Pharmacia Biotech GFX™ PCR-DNA und Gelelutionssystem.

Das DNA-haltige Gelstück wurde unter UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten, gewogen und pro 10 mg Gel mit 10 µl Gelelutionspuffer I versetzt. Unter Schütteln wurde 10 min bei 60°C inkubiert und danach eine GFX-Säule mit dem gelösten Gelstück beladen.

Bei der Aufbereitung von PCR-DNA oder Restriktions-Ansätzen wurde eine GFX-Säule einfach mit 500 µl Gelelutionspuffer äquilibriert und die DNA-Lösung hinzugefügt.

Die Säule wurde in ein Sammelröhrchen gestellt und 30 sek bei 10000 x g zentrifugiert. Dann wurde die Säule mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen gebracht und die DNA nach 1 min Inkubation mit 50 µl Tris-HCl, pH 7,4, unter Zentrifugieren (10000 x g, 30 sek) eluiert.

## 1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA durch Extinktionsmessung

Zur Bestimmung von Ausbeute und Reinheit präparierter DNA (IV.1.8.1) wurde die Extinktion bei 260 und 280 nm gemessen. Die Nukleinsäurelösung wurde in geeigneter Verdünnung in $H_2O$ gegen Wasser als Blindwert unter Verwendung von Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) gemessen (Gene Quant RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech). Das Verhältnis der Extinktionen $E_{260}/E_{280}$ diente dabei der Güteabschätzung der Präparation.

## 1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 1.8.1 Standard PCR

[90]

Die Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl bzw. 100 µl bei überlappender PCR (IV.1.8.2a) im folgenden Ansatz durchgeführt:

| | |
|---|---|
| Matrize: Plasmid-DNA | 50 ng |
| Oligonukleotid 1 | 20 pMol |
| Oligonukleotid 2 | 20 pMol |
| dNTPs | 0,5 mM |
| PCR-Puffer (10x) | 5 µl bzw. 10 µl |
| TurboPfu-Polymerase | 1,25 U |

Bei Amplifizierung von DNA-Fragmenten hohen GC-Gehalts wurde dem Standardansatz DMSO (5% (v/v) *f.c.*) zugegeben.

Der Ansatz wurde zur vollständigen Denaturierung 3 min bei 94°C inkubiert. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Trio-Block (Biometra Trio *Heated Lid*) in 20 Temperaturzyklen unter folgenden Bedingungen:

| | | |
|---|---|---|
| Denaturierung | 94°C | 1 min |
| Hybridisierung | ($T_m$-4°C) | 20-60 s, mit QuickChange™ (1.8.2b) 55°C 1 min |
| Synthese | 72°C | 1 min/kb., mit QuickChange™ 68°C, 2 min/kb |

Zur Berechnung der Schmelztemperaturen $T_m$ der Oligonukleotide wurde die nachstehende Gleichung verwendet: $T_m = 4 \times \text{Anzahl (G + C)} + 2 \times \text{Anzahl (A + T)}$.

Bei unterschiedlichen Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide wurde die Hybridisierung bei dem niedrigeren $T_m$-Wert durchgeführt.

Zur vollständigen Synthese der Produkte wurde der Ansatz anschließend 10 min bei 72°C inkubiert, danach bei 4°C gelagert. Das PCR-Produkt wurde durch Gelelektrophorese (IV.1.5) analysiert, gereinigt (IV.1.6) und anschließend in Klonierungen eingesetzt.

### 1.8.2 Hot start PCR

[12]

Um eine unspezifische Anlagerung von Oligonucleotiden an die DNA-Matrize während der Aufwärmphase und eine damit verbundene Amplifizierung unerwünschter Produkte zu vermeiden, wurde die Pfu-Turbo Polymerase erst nach einer 5 minütigen Inkubationszeit in den Ansatz pipettiert. Dieses Verfahren wurde bei allen PCR-Reaktionen angewendet.

### 1.8.3 In vitro-Mutagenese

**a) Overlap-PCR**

[39]

Mit Hilfe der Overlap-PCR wurden Sequenzen in ein DNA-Fragment eingeführt. Dabei wurden zunächst zwei separate PCR-Ansätze durchgeführt mit zwei komplementären Oligonukleotiden, die die Sequenz enthielten und zwei spezifischen Oligonukleotiden aus dem Bereich, der in 3'-Richtung der zu mutierenden Position lag. Bei längeren einzuführenden Sequenzen wurden in einer der ersten separaten PCR-Ansätze 3 Primer verwendet, die aufeinander folgend und teilweise überlappend für die einzuführende Sequenz kodierten. Damit wurde eine größere Überlappungszone der zuvor in den ersten PCRs synthetisierten Fragmente geschaffen und in der anschließenden PCR mit Hybridisierungsreaktion ein Syntheseabbruch verhindert. Die erhaltenen Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgereinigt (IV.1.6) und in äquimolaren Mengen in eine dritte PCR eingesetzt. In dieser Reaktion erfolgten eine Hybridisierung der Fragmente in ihrem überlappenden Bereich und die Synthese eines doppelstrangigen DNA-Moleküls durch zwei Zyklen ohne den Einsatz von Oligonukleotiden unter folgenden Bedingungen:

| | | |
|---|---|---|
| Denaturierung | 94°C | 2 min |
| Hybridisierung | 40°C | 3 min |
| Synthese | 72°C | 3 min. |

Nach Zugabe der spezifischen Oligonukleotide wurde dieses die Sequenz enthaltende DNA-Molekül wie in IV.1.8.1 amplifiziert, das PCR-Produkt gelelektrophoretisch aufgereinigt (IV.1.6) und in Klonierungen eingesetzt.

**b) Einführung von Mutationen und Deletionen durch QuickChange™**

[95]

Alle Punktmutationen und Deletionen wurden mit dem QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene eingeführt.

Hierbei wurde bakteriell replizierte Plasmid-DNA als Matrize und zwei komplementäre, die Mutation/ Deletion enthaltene Primer in einer Standard-PCR (IV.1.8.1) eingesetzt. Als DNA-Polymerase wurde Pfu-Turbo eingesetzt, welche die Primer bei der PCR einfach verlängert, ohne die Mutation/ Deletion zu verändern. In einem anschließenden Restriktionsverdau mit 10 U des Restriktionsenzyms Dpn I wurde die methylierte bakterielle Matrize anschließend verdaut, so dass nur die replizierte unmethylierte DNA mit der Mutation/ Deletion intakt blieb.

Das unverdaute Produkt konnte direkt in E.coli $XL_1$-blue transformiert werden (IV.1.1.3). Zur Kontrolle wurde die extrahierte Plasmid-DNA einer Mini-Präparation (IV.1.2.1) sequenziert.

## 1.9 Sequenzierung von DNA

[92]

Die Sequenzierung doppelstrangiger DNA erfolgte unter Verwendung des ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Kits und des ABI 377 DNA Sequenziergeräts (Perkin Elmer). Die Probenaufbereitung und die Beschickung des Geräts wurde von den Mitarbeitern der Servicegruppe ”Sequenzierung” am ZMNH durchgeführt.

## 2. Proteinbiochemische Methoden

### 2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

[54]

Die Analyse von Proteinen und Proteingemischen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidelektrophorese in Mini-Protean II Elektrophoresekammern (Bio-Rad). Die Abmessungen und Zusammensetzungen von Trenn- und Sammelgel waren wie folgt:

Trenngel: Höhe 4,5 cm, Dicke 1,5 mm
9-15% (v/v) Acrylamidlösung (Protogel, Biozym) in Trenngelpuffer
1 mg/ml APS, 1 µl/ml TEMED

Sammelgel:. Höhe 0,8 cm, Dicke 1,5 mm
3% (v/v) Acrylamidlösung (Protogel, Biozym) in Sammelgelpuffer
1 mg/ml APS, 1 µl/ml TEMED

Nach vollständiger Polymerisation erfolgte die Elektrophorese bei einer Spannung von 200 V in Laufpuffer, dabei diente der Farbstoff des Probenpuffers als Laufzeitmarker. Die Proteinproben wurden zuvor in Laemmli-Probenpuffer (2x) aufgenommen. Die Proben wurden nativ (U= unboiled) oder bei Bedarf durch 5 min Erhizten auf 95°C denaturiert (B= boiled).

Die Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese in Färbelösung inkubiert (RT, 20 min) und anschließend zur Entfernung der Hintergrundfärbung mit Entfärbelösung gewaschen.

### 2.2 Photometrische Quantifikation von Protein

Die Abschließende Kanalprotein-Konzentration in der Lösung wurde photometrisch durch eine Wellenlängen-Rasterabtastung (wavescan) mit dem Photometer zwischen 200 nm und 340 nm dargestellt, wobei zur Abschätzung der Konzentration der Absorptionsunterschied zwischen 280 nm und 320 nm genutzt wurde. Zur Umrechnung wurde ein Extinktionskoeffizient von 0.578 angenommen, also 1 OD entspricht 0.578 mg/ml Protein. Der Extinktionskoeffizient errechnete sich aus der Aminosäuresequenz

der Kanalproteine, der mit Hilfe des Online-Programms „ProtParam tool“ des Schweizerischen Institutes für Bioinformatik (SIB) unter der Web-Seite http://www.expasy.org/tools/protparam.html errechnet wurde.

## 2.3 Western Blot-Analyse

### 2.3.1a Elektrophoretischer Transfer

[99]

Für den Proteintransfer aus einem SDS-PAA-Gel (MMM) auf eine Nitrocellulosemembran (Protran Nitrocellulose BA 85, 0,45 µm, Schleicher & Schüll) wurde eine MINI TRANSBLOT-Apparatur (BioRad) verwendet. Nach der SDS-PAGE wurde unter Blotpuffer ein Transferstapel (Schwamm, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier, Schwamm) luftblasenfrei aufgebaut. Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei 4°C in Blotpuffer (200 mA, 120 min). Als Molekulargewichtsmarker wurde BenchMark™ (Gibco BRL) verwendet, dessen farbige Banden auf die Membran übertragen wurden, was zusätzlich als Kontrolle des Transfers diente.

### 2.3.1b Dot Blot

Es wurden 100 µl des in Lösung befindlichen Proteins aus der Elution auf einer in PBS eingeweichte Nitrozellulose mit der Schleicher & Schuell Vakuum-Filtration immobilisiert und anschließend bei RT getrocknet.

### 2.3.2 Immunologischer Nachweis an Nitrocellulose gebundener Proteine

[4]

Nach Beendigung des elektrophoretischen Transfers bzw. der Dot-Blot-Immobilisation wurde die Nitrocellulosemembran unter Schütteln in Blocklösung inkubiert (30-60 min, RT). Anschließend erfolgte die Inkubation mit in Blocklösung geeignet verdünntem Antiserum bzw. Erstantikörper (2h, RT oder 4°C, ü.N.). Nach dreimaligem Waschen

mit PBS (je 5 min) wurde die Membran in dem in PBS 1:5000 verdünnten Peroxydase-gekoppelten Schaf-Anti-Maus-Zweitantikörper geschüttelt (pGaR) (30-60 min, RT). Die Membran wurde erneut mit PBS gewaschen (5x, je 5 min) und in die Chemilumineszenz-Reaktion eingesetzt (IV.2.2.3).

### 2.3.3 Antikörpernachweis durch Chemilumineszenz

Die Antikörperreaktion wurde durch die bei der Substratumsetzung durch die Peroxydase entstehende Chemilumineszenz nachgewiesen. Die Membran wurde 1 min bei RT mit Detektionsreagenz (1:1 Mischung aus Detektionslösungen I und II) inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und restliche Flüssigkeit durch kurzes Pressen zwischen Filterpapieren beseitigt. Nach luftblasenfreiem Bedecken mit Klarsichtfolie wurde die Membran einem Röntgenfilm exponiert (30-60 s, Kodak Biomax-MR).

## 2.4 Expression in *Escherichia coli*

[4]

Zur Überexpression von Proteinen erfolgte die Klonierung der entsprechenden DNA in die jeweiligen Expressionsvektoren, so dass ein durchlaufender Leserahmen mit der für den Fusionsanteil kodierenden Sequenz gewährleistet war. Nach Transformation des empfohlenen *E.coli* Stamms (IV.1.1.3) wurde eine 5 ml-Kultur (LB bzw. Superbroth, supplementiert mit Antibiotikum) aus einer Einzelkolonie plasmidtragender *E. coli* Zellen angeimpft und im Warmluftschüttler inkubiert (180 Upm, 8 h, 37°C). Für eine weitere Vorkultur wurden aus dem 1. Inkubationsansatz 10 µl entnommen und 100 ml Medium für die Expression einer 1 Liter Kultur angeimpft. Für eine 8 Liter Expression wurden 50 µl der 1. Vorkultur entnommen und 500 ml SB-Medium angeimpft. Die 2. Vorkultur wurde im Warmluftschüttler inkubiert (180 Upm, ü.N, 37°C). Von dieser Vorkultur wurde ein nach folgender Formel abgeschätztes Volumen entnommen und mit Medium auf 1 bzw. 8 Liter aufgefüllt, so dass die Startkultur eine $OD_{600}$ von ~ 0,2 hatte:

$0{,}2 / OD_{600} * 1000$ ml bzw. 8000 ml = x ml Vorkultur

Die Startkultur wurde dann bis zu einer $OD_{600}$ von 0,5 bis 1,0 im Warmluftschüttler inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG (0,1-0,5 mM *f.c.*) induziert und die Kultur weitere 2-6 h (32°C) bis zu einer $OD_{600}$ von 1,5 oder einer abnehmenden $OD_{600}$ inkubiert. Die Zellen wurden anschließend sedimentiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

Zur Kontrolle des Expressionsverlaufs wurden in regelmäßigen Abständen Proben der Kultur genommen, die Bakterien sedimentiert, in Probenpuffer aufgenommen und durch SDS-PAGE (IV.2.1) analysiert.

Die Modifikationen, die sich aus der Verwendung verschiedener Expressionssysteme ergaben, werden im Folgenden (IV.2.4.1) aufgeführt.

### 2.4.1 Expression in E. coli mit dem pQE-System

[83]

Die für das Zielprotein kodierende DNA wurde in den Vektor pQE32 bzw. pQE70 kloniert und das Plasmid in *E. coli* M15pREP4-Zellen transformiert. Das gewünschte Protein wurde als Fusionsprotein mit einer N-terminalen (pQE32) bzw. C-terminalen (pQE70) Poly-Histidin-Domäne exprimiert.

## 2.5 Lyse von Bakterien

### 2.5.1 Aufschluss mit hydraulischer Motorpresse, Gewinnung der Bakterienmembranen

Die Bakterienkultur wurde zentrifugiert (8000 x g, 4°C, 10 min) und das Sediment in BAK-Puffer (versetzt mit Proteinase-Inhibitoren(1 mM PMSF, 2 µM Leupeptin, 2µM Pepstatin A, *f.c.*)) aufgenommen (22,5 ml pro 1 l Bakterienkultur). Die Suspension wurde in eine vorgekühlte French-*Pressure*-20K-Aufschlusszelle (Kapazität: 40 ml) überführt. Die Bakterien wurden komprimiert (Spectronic Instruments/SLM Aminco, 20000 psi). Die Lyse erfolgte durch den Druckausgleich beim behutsamen Öffnen des Ausflussventils der Aufschlusszelle. Der Vorgang wurde wiederholt, das Lysat

anschließend bei 12000 x g 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde der Ultrazentrifugation (110000 x g, 1 h, 4°C) zugeführt. Die pelletierten Bakterienmembranen konnten resuspendiert in Miller-Succrose bei –70°C gelagert werden, oder der Ni-NTA-Agarosegel Extraktion zur Proteinextraktion zugeführt werden.

## 2.6 Proteinextraktion und –immobilisation auf NiNTA-Agarosepartikeln

[83]

Aufgrund der Poly-Histidin-Domäne an den terminalen Enden der Proteine konnten diese mit auf einer festen Matrix gebundenen Ni-NTA (Nickel-Nitrotriacetylsäure), dessen freie Ligandenbindungsstellen am Nickel-Atom mit der Poly-Histidin-Domäne interagieren konnte, extrahiert bzw. immobilisiert werden. Zur Extraktion wurden die Bakterienmembranen zuerst in 22,5 ml BBK-Puffer mit 40 mM DM pro 1 L Bakterienkultur ü.N. bei 4°C auf einem Schüttler (175 Upm) inkubiert, um die Proteine aus den Membranen zu lösen. Dann wurde erneut ultrazentrifugiert (100000 x g, 1 h, 4°C) und der Überstand mit den Proteinen weiterverarbeitet.

Um unspezifische Bindung des Ni-NTA-Komplexes auszuschließen, wurde während allen Bindungsreaktionen der pH auf 7,8 gehalten und 30 mM Imidazol zugegeben. Es wurde Ni-NTA-Agarosegel zur Extraktion und eine magnetische Ni-NTA Agarose-Sonde, die mit dem magnetischen 12-Röhrchen-Ständer (Quiagen) extrahiert werden konnte, zur Immobilisation von Protein benutzt. Zur Bindung des Proteins an den Ni-NTA-Komplex wurde 90 min auf dem Schüttler (175 Upm) bei 4°C inkubiert. Die Bindung des Proteins an die magnetische Ni-NTA-Agarose-Sonde wurde nach Elution mit BBK I 400-Puffer mittels Dot Blot (IV.2.2.1b) verifiziert.

Zur Elution wurde das Ni-NTA-Agarosegel nach Proteinbindung in einer zuvor mit 2 Säulenvolumen (SV) BBK I 30-Puffer äquilibrierten Elutionssäule mit Spritzenvorsatzfilter (Milltex HA, ∅ 45 µm, Millipore) in freiem Fluss aufgetragen und mit weiteren 2 bzw. 10 SV für eine 1 bzw. 8 L Kultur gewaschen. Dann wurde das Protein von der Ni-NTA-Agarose mit 1 bzw. 2 SV BBK I 400-Puffer eluiert. Letzte Waschgänge und die komplette Elution wurden in 1 ml Fraktionen aufgefangen, um mit der $OD_{280}$ die Proteinkonzentration in den Fraktionen zu ermitteln und ein Wasch- und

Elutionsprofil erstellen zu können. Die Elutionsfraktionen mit Proteinen wurden konzentriert und entsalzt (IV.2.7).

## 2.7 Konzentration und Entsalzung von Proteinen

### 2.7.1 Zentrifugenfilter

Zur Verdichtung der Proteine wurden Microsep Microconcentrators (Filtron Technologoy Corporation) verwendet, deren Porengröße sich nach Proteingröße richtete. Für Kanalprotein wurde ein 30 kDa Filter benutzt, für Toxine ein 1 kDa Filter. Es wurde bei 7500 x g zentrifugiert, bis das Volumen auf 500-200 µl eingeengt war. Durch mehrfaches Verdünnen mit BBK 4 mM DM und erneutes Einengen konnte entsalzt werden. Endprodukte wurden photometrisch bei 280 nm quantifiziert und durch SDS-PAGE (IV.2.1) analysiert.

### 2.7.2 FPLC-Säulenchromatographie

Zur schnellen Eliminierung des Imidazols aus der Elution wurde eine FPLC-Säulenchromatographie (Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC) angewendet. Das Eluat wurde auf eine „HiTrap™ Desalting“-Säule mit „Sephadex™ G-25 Superfine“ als Matrix (Amersham) aufgetragen. Die Flussrate des Laufpuffers betrug 1 ml/min. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt und die Protein enthaltenden Fraktionen vereint und im Zentrifugationsfilter (IV.2.7.1) konzentriert.

## 2.8 Pharmakologische Charakterisierung von Kanalproteinen

### 2.8.1 Phagen-Screening mit einer Phagenbibliothek

[71]

#### 2.8.1a Inkubation

Zur Identifikation charakteristischer Bindungsstellen in der Porenregion von Kanalprotein wurde mit einer Ph.D.-7™ Phagenbibliothek von New England BioLabs inkubiert. Spezifisch bindende Phagen wurden in 3 Selektionsrunden (Panning-Runden) von Inkubation, Elution und Amplifikation der Phagen mit dem Skorpiongift KTX identifiziert. Um unspezifisch bindende Phagen aus der Bibliothek zu eliminieren, wurde in einem der drei Inkubationen während der drei Panning-Runden mit dem auf magnetischer Ni-NTA-Agarose immobilisiertem Wildtyp-Kanal KcsA inkubiert. In den Inkubationsschritten wurden 200 ng Kanalprotein mit $2 * 10^{11}$ Plaque forming units (pfu) der Phagen in 400 µl BBK I 400-Puffer + 0.5% BSA inkubiert (40 min, RT). Auf dem magnetischen Röhrchenständer extrahiertes Kanalprotein wurde 5 mal mit 500 µl BBK I 20-Puffer gewaschen, anschließend mit 100 nM KTX in 500 µl BBK I 20-Puffer eluiert. Zur Elution von unspezifisch bindenden Phagen wurde 1 mM DTT verwendet. In allen Lösungen wurden die Phagen titriert (IV.2.8.1c). Nach der 3. Panning-Runde wurden Phagen-Plaques mit spezifisch bindenden Phagen isoliert und die Phagen-DNA sequenziert (IV.1.2.3).

#### 2.8.1b Amplifikation

Die spezifisch bindenden Phagen der Elution bzw. des Überstandes nach Wildtyp Inkubation mit KcsA wurden anschließend amplifiziert. Hierzu wurde eine 1:100 verdünnte ü.N. Vorkultur von E.coli ER2738 in 20 ml LB-Medium mit den zu amplifizierenden Phagen angeimpft und 5 h im Warmluftschüttler (37°C, 175 Upm) inkubiert. Danach wurden die Zellen pelletiert (10000 x g, 10 min, 4°C) und der die Phagen enthaltende Überstand erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1/6 des Endvolumens mit PEG/NaCl aufgefüllt und die Phagen ü.N. bei 4°C präzipitiert. Es

wurde erneut zentrifugiert (10000 Upm, 15 min, 4°C) und das Pellet in 1 ml BBK I 20 resuspendiert. Erneut wurde 200 µl PEG/NaCl hinzugefügt, 1 h auf Eis inkubiert und in der Tischzentrifuge (14000 Upm, 10 min) pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µl BBK I 20-Puffer + 0,02% $NaN_3$ resuspendiert und zur Ermittlung des Phagentiters für die folgende Inkubation eine Phagentitration durchgeführt. Um Verklumpungen der Phagen zu vermeiden, mussten die Pellets bei Resuspensionsschritten min. 1 h bei 4°C unter schütteln resuspendiert werden.

### 2.8.1c Titration

Um der Phagentiter einer Lösung zu ermitteln, wurden Verdünnungsreihen angefertigt, zur optimalen Bestimmung sollten Verdünnungen von 50 pfu/ 10 µl ausplattiert werden. Folgende Verdünnungen aus 1:10 Verdünnungsreihen wurden ausplattiert:
Überstände: $10^{-8}$, $10^{-10}$ und $10^{-12}$.
Waschgänge: $10^{-5}$ und $10^{-6}$, sowie 1:1 vom 5. Waschgang.
Elutionen: $10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$ und $10^{-4}$.
Amplifikationen: $10^{-9}$, $10^{-10}$, $10^{-11}$ und $10^{-12}$.
10 µl der einzelnen Phagen-Verdünnung wurden mit je 200 µl einer Kultur ER2537 in LB-Medium mit einer $OD_{600}$ von ~ 0,5 5 min inkubiert. Die infizierten Bakterien wurden in 3 ml verflüssigten Agarose-Top gebracht und nach Mixen schnell auf einer LB-IPTG-Xgal-Platte gleichmäßig ausgeschwenkt. Die Platte wurde ü.N. bei 37°C inkubiert. Um den Phagentiter in pfu/ 10 µl einer Lösung zu bestimmen, wurden die lytischen blauen Phagen-Plaques der Platten gezahlt und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

### 2.8.2 Charakterisierung von Bindungsverhalten mittels Bindungsassays

Alle Versuchsansätze wurden zur Ermittlung eines Durchschnittswertes doppelt pipettiert.

#### 2.8.2a Vorversuche

Zur Identifikation der optimalen Bindungsverhältnisse wurden verschiedene Konzentrationen von Kanalprotein bzw. Bakterienmembranen als Rezeptor und radioaktiv markiertem Toxin als Liganden inkubiert. Als Kompetitor wurde unmarkiertes Toxin in 1000-fach höherer Konzentration verwendet. Filter wurden wie in IV.2.10.2b filtriert und gemessen. Der im γ-Zähler ermittelte Unterschied in counts per minute (cpm) zwischen Inkubationsansätzen ohne Kompetitor und mit ergab die spezifische Bindung. Die unspezifische Bindung ergab sich aus der totalen Bindungskapazität ohne Kompetitor abzüglich der spezifischen Bindung. Versuchsbedingungen mit möglichst hoher spezifischer und möglichst niedriger unspezifischer Bindung wurden gewählt.

#### 2.8.2b Homologe kompetitive Bindungsassays, Ermittlung der $IC_{50}$

Die Versuche wurden in verschiedenen Reaktionsvolumina mit konstanten Konzentrationen des radioaktiv markierten Toxins und Kanalprotein in Bindungs-Puffer + 2 mM DM, bei Bakterienmembranen ohne DM, durchgeführt. Als Kompetitor wurden Verdünnungen von 1:5 und 1:10 Verdünnungsreihen von $10^{-6}$ M bis $10^{-14}$ M des unmarkierten Toxins hinzugefügt und bis zum Reaktionsgleichgewicht 2 h inkubiert. Die Inkubationen wurden dann unter Vakuum durch zuvor in 0,5% PEI bei 4°C inkubierte GF/C-Filter (Whatman) filtriert, die Reaktionsgefäße 3 mal mit Waschpuffer gewaschen und die Waschgänge ebenfalls filtriert. Die Filter wurden anschließend mit 4 ml Waschpuffer gespült und im γ-Zähler gemessen.

### 2.8.2c Kinetisches Bindungsverhalten

Dissoziationsrate $K_{off}$

Verdünnungen von 1:500 und 1:1000 der Bakterienmembranen wurden in 0,5 und 1 ml Reaktionsvolumina mit 10 pM radioaktivem Toxin ü.N. inkubiert. Zum Ansatz wurde dann 50 nM unmarkierten Toxins gegeben und das radioaktive Toxin vom Rezeptor verdrängt. Diese Reaktion wurde nach bestimmten Zeiten zwischen 10 sek und 2 h durch Verdünnung der Reaktion mit 3 ml Waschpuffer und schnelle Filtration und Waschen wie in IV.2.10.2b gestoppt. Die Filter wurden anschließend im γ-Zähler gemessen.

Assoziationsrate $K_{on}$

In 1 und 2 ml Reaktionsansätzen wurden 1:500, 1:1000 und 1:2000 Verdünnungen der Bakterienmembran mit 10 pM radioaktivem Toxin für eine bestimmte Zeit zwischen 1 sek und 2 h inkubiert und die Assoziationsreaktion durch Verdünnung mit 3 ml Waschpuffer und schnelle Filtration und Waschen gestoppt (IV.2.8.2b). Die Filter wurden im γ-Zähler gemessen.

## 3. Computergestützte Bindungs- & Sequenzanalysen

Computergestützte Analysen von DNA-und Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des Lasergene-Programmpaketes DNASTAR, *Inc.*, www.dnastar.com) durchführt. Die Analyse der Daten aus Bindungsassays sowie die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism®von GraphPad Software, Inc., Version 3.02, www.graphpad.com.

# V Ergebnisse

## 1. Chimären und Proteinexpression:

### 1.1 Benutzte KcsA-Chimären aus den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen Kv1.1 und Kv1.3

Die in Tabelle 1 aufgeführten P-Loop Sequenzen der S5/S6-Region von Kv1.1 und Kv1.3 wurden von Legros et al. in die M1/M2-Region des Wildtyp-Kanals KcsA kloniert [58], so dass sie im Folgenden für Expression und Bindungsassays zur Verfügung standen. Als wichtige Bindungsstrukturen stellten sich die Subregionen I und III heraus, die im Weiteren modifiziert wurden. Die Subregionen I und III bildeten die Porenkanzelregion (turret) und den äußeren Poreneingang, weshalb die Bindung eines Kanalblockers in dieser Region wahrscheinlich war. Die Subregion II, die auch die Signatursequenz (II.1) enthielt, wurde aus KcsA beibehalten.
In dieser Arbeit wurden die KcsA-Kv1.3 Chimären IV, VIII und VIII-G56T, sowie die Chimären KcsA-Kv1.1 und KcsA-Kv1.1-L81M in Bindungsassays untersucht (IV.4).

| | 50 60 70 80 90<br>S5/M1 SI SII SIII S6/M2 |
|---|---|
| KcsA | AVLAERGAPGAQLITYPRALWWSVETATTVGYGDLYPVTLWGRLV |
| Kv1.1 | VYFAEAEEAESHFSSIPDAFWWAVVSMTTVGYGDMYPVTIGGKIV |
| Kv1.3 | VYFAEADDPTSGFSSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMHPVTIGGKIV |
| Chi IV(E) | AVLAEADDPTSGFSSIPDALWWSVETATTVGYGDLYPVTLWGRLV |
| Chi VIII | AVLAERGAPGSGFSSIPDALWWSVETATTVGYGDMHPVTLWGRLV |
| Chi VIII-G56T | AVLAERGAPTSGFSSIPDALWWSVETATTVGYGDMHPVTLWGRLV |
| KcsA-Kv1.1 | AVLAEAEEAESHFSSIPDALWWSVETATTVGYGDLYPVTLWGRLV |
| KcsA-Kv1.1-L81M | AVLAEAEEAESHFSSIPDALWWSVETATTVGYGDMYPVTLWGRLV |

**Tab. 1: Gegenüberstellung der S5/M1-S6/M2-Regionen benutzter KcsA-Kv1.3 (Chimäre IV& VIII) und KcsA-Kv1.1 Chimären.** Die S5/S6-Region von Kv1.1 und Kv1.3 bzw. Teile davon wurden in die M1/M2-Region des bakteriellen KcsA-Kanals eingeführt (rote Abschnitte), grau unterlegt am Beispiel KcsA sind Subregionen I& III, dazwischen S II.

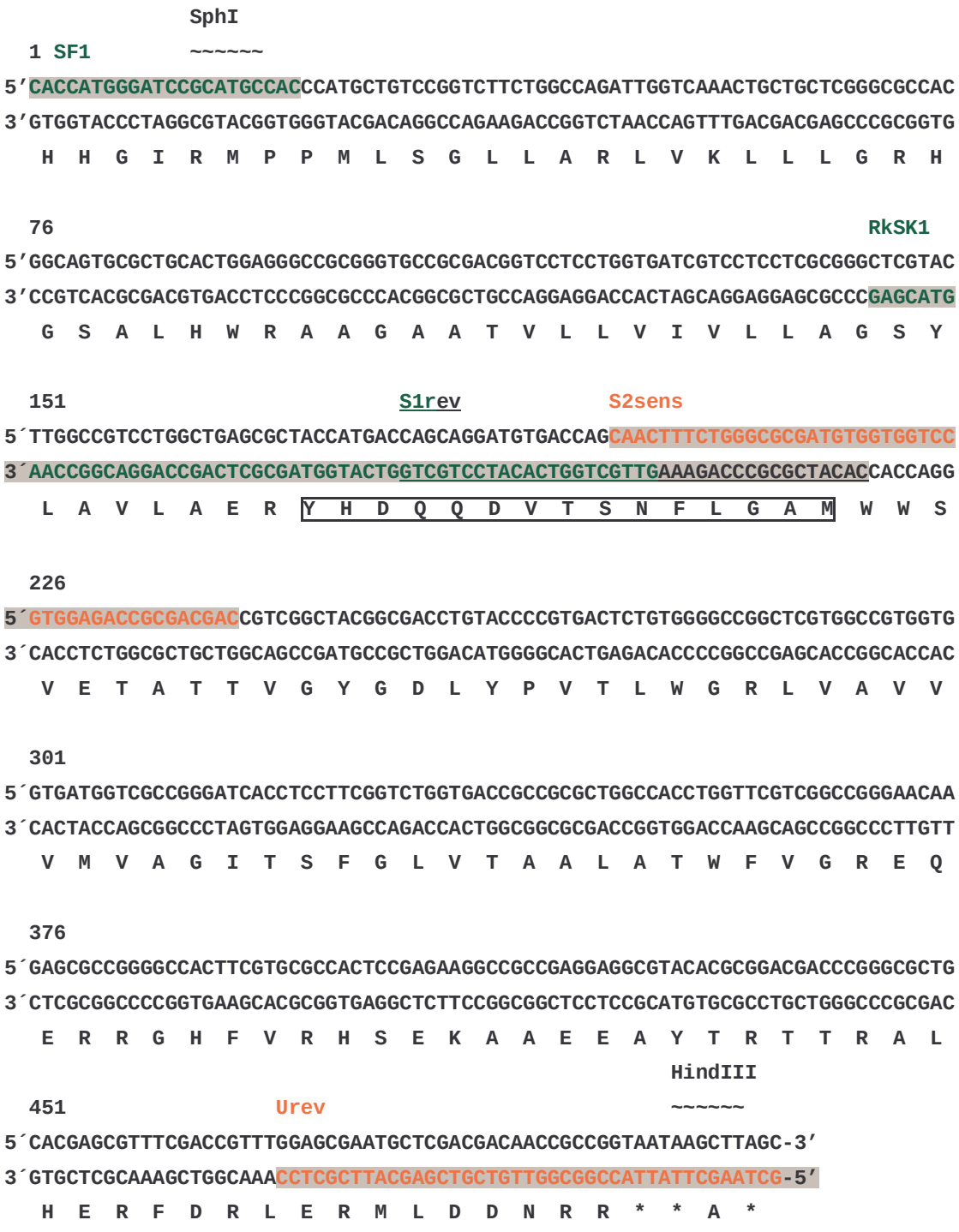
## 1.2 Geplante KcsA-Chimären aus dem kalziumaktivierten, niederkonduktiven Kaliumkanal $SK_{Ca}2$ : KcsA-Ska, KcsA-Skb, KcsA-Ska-F103L, KcsA-Skb-F103L

In einer Overlap-PCR wurden Teile der P-Loop Sequenz der S5/S6-Region des kalziumabhängigen, niederkonduktiven Kaliumkanals rSK2 in die entsprechende M1/M2-Region von KcsA substituiert (V.1.2.1). Es wurden nur Aminosäuren der Subregion I im P-Loop von KcsA durch die entsprechenden Aminosäuren der homologen Region von rSK2 ersetzt. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht des rSK2-Kanals und der Chimären in der P-Loop Sequenz. Während KcsA-Ska noch die gesamte Subregion I von rSK2 enthielt, ist in KcsA-Skb die zuvor inserierte Aminosäure Tyrosin an Position 53 eliminiert und das Histidin an Position 54 durch Glycin ersetzt worden.
Als erstes Klonierungsprodukt entstand die KcsA-SkI Chimäre, die sich als nicht Apamin sensitiv herausstellte. Für alle natürlichen Kaliumkanäle $SK_{Ca}$1-3 konnte eine Apaminsensitivität festgestellt werden, die es für die neuen Chimären zu untersuchen galt. Grün herausgestellt sind Strukturen, von denen über eine Bindungssensitivität gegenüber Apamin berichtet wurde [31], sowie die Mutation F103L in SKa und SKb (gelb).

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | Apamin- |
| | | | | | | | sensitiv |
| | | S5/TM1 | SI | SII | SIII | TM2/S6 | |
| KcsA | | AVLAER-GAPGAQLITYPRALWWSVETATTVGYGDLYPVTLWGRLV | | | | | |
| rSK2 | 330- | VRACERYHDQQDVTSNFLGAMWLISITFLSIGYGDMVPNTYCGKGVC | | | | | ja [31] |
| | | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| KcsA.SK I | | AVLAER-GAQQDVFSSIPDALWWSVETATTVGYGDLYPVTLWGRLVAVVVMVAGITSFGLV | | | | | |
| KcsA.SKa | | AVLAERYHDQQDVTSNFLGAMWWSVETATTVGYGDLYPVTLWGRLVAVVVMVAGITSFGLV | | | | | |
| KcsA.SKb | | AVLAER-GDQQDVTSNFLGAMWWSVETATTVGYGDLYPVTLWGRLVAVVVMVAGITSFGLV | | | | | |
| KcsA.Ska-F103L | | AVLAERYHDQQDVTSNFLGAMWWSVETATTVGYGDLYPVTLWGRLVAVVVMVAGITSLGLV | | | | | |
| KcsA.SKb-F103L | | AVLAER-GDQQDVTSNFLGAMWWSVETATTVGYGDLYPVTLWGRLVAVVVMVAGITSLGLV | | | | | |

**Tab. 2: Gegenüberstellung des kalziumabhängigen Kaliumkanals rSK2 im Vergleich zum Wildtypkanal KcsA.** Für die geplanten Chimären KcsA-Ska und KcsA-Skb wurde die Subregion I der S5-S6-Region des rSK2-Kanals ausgewählt und in die entsprechende Region des KcsA-Kanals kloniert. Schwarz: Sequenzen aus rSK2 im KcsA; grün: sensitive Strukturen zur Apaminbindung; gelb: Mutation F103L in SKa und SKb, grau unterlegt: Subregionen I& III, dazwischen S II.

### 1.2.1 Konstruktion der Chimäre KcsA-Ska im Vektor pQE32




**Tab. 3: DNS- und Aminosäuresequenz des durch Overlap-PCR hergestellten Inserts von KcsA-Ska.** Benutzte Oligonukleotide sind farbig unterlegt. Die in KcsA substituierte Aminosäuresequenz in Subregion I ist eingerahmt. Ebenfalls dargestellt sind die Angriffspunkte der Restriktionsendonukleasen (~~~), die benutzt wurden, um das Insert in den Vektor pQE32 zu ligieren.

Zum Austausch der Subregion I des M1-M2-Linkers von KcsA mit der von rSK2 in der S5-S6-Region zur Konstruktion von Ska wurde ein Insert durch Overlap-PCR synthetisiert (IV.1.8.3a), das im Folgeschritt in den Vektor pQE32 ligiert wurde. In einem ersten Schritt zur Synthese des Inserts wurden hierzu zwei sich in der Porenregion des S5/M1-S6/M2- Linkers überlappende PCR-Produkte hergestellt. Als Primer für diese Produkte dienten in PCR 1 (grün unterlegt) SF1, S1rev und RkSK1, in PCR 2 (rot unterlegt) S2sens und Urev (IX.8) zusammen mit dem Vektor des Wildtyp-Kanals KcsA pQE32 als Matrize (Tab. 3). Fragmente wurden in einer Gelelektrophorese aufgetrennt (IV.1.5), aufgereinigt (IV.1.6) und in einer zweiten PCR-Reaktion mit den beiden ersten PCR-Produkten das Insert für den Vektor synthetisiert. Nach erneuter gelelektrophoretischer Auftrennung wurden sowohl das Insert als auch der Vektor pQE32 mit Wildtyp-Kanal KcsA mit Restriktionsendonukleasen SphI und HindIII verdaut (IV.1.4.1). Nach Auftrennung wurden die Produkte ligiert (IV.1.4.3) und in E.coli XL1-Blue transformiert (IV.1.1.3). Nach Mini- und Midi-Präparation (IV.1.2) wurde die DNA der KcsA-Chimären durch abschließende Sequenzierung mit den von QiaExpressionist empfohlenen Primern QnP1 und QER (IX.8) kontrolliert.

### 1.2.2 Konstruktion der Chimäre KcsA-Skb in pQE32

Zur Herstellung von KcsA-Skb in pQE32 wurde eine QuickChange®-PCR angewendet (IV.1.8.3b). Als Matrize hierzu diente der Klon KcsA-Ska im Vektor pQE32. Es wurden die Primer Skbfor und Skbrev (IX.8) verwendet. Nach Transformation in E.coli XL1-Blue (IV.1.1.3) und Mini-Präparation (IV.1.2.1) in E.coli pPREP4 M15 wurde die Chimären-DNA durch Sequenzierung mit entsprechenden Primern wieder kontrolliert.

### 1.2.3 Eliminierung von Mutationen aus den Chimären KcsA-Ska-F103L und KcsA-SKb-F103L

Wie sich in der Sequenzierung der ersten beiden Chimären herausstellte, enthielt diese eine Mutation eines Phenylalanins an Position 103 der Aminosäuresequenz zu einem Leucin, die sich bereits in der Matrizen-DNA des Wildtyp-Vektors KcsA wiederfand. Da diese Mutation von der Transmembranregion 2 des Kanals in das Innere der Kanalpore zeigte und somit u.U. Einfluss auf die Stabilität der Kanalproteinstruktur und das Bindungsverhalten in nachfolgenden Bindungsassays mit entsprechenden Liganden haben könnte [75,36], wurde diese Mutation eliminiert. Hierzu wurde wieder die QuickChange®-Methode angewendet (IV.1.8.3b). Als Primer diente hier L103Fsens und L103Frev (IX.8). Die Vektor-DNA wurde wieder durch Sequenzierung kontrolliert. Die Sequenzierungen zeigten eine erfolgreiche Klonierung des Ska- bzw. SKb-Kanals in den pQE32-KcsA Wildtyp Vektor und Eliminierung der Mutation F103L, wie sie in Tabelle 2 gezeigt sind.
Eine komplette Vektorkarte befindet sich im Anhang (IX.10).

## 2. Kanalproteinexpression

### 2.1 Wachstumskontrolle von KcsA-Ska und KcsA-Skb

Um die klonierten Chimären KcsA-Ska und KcsA-Skb, wie auch die anderen Kanal-Chimären, durch nachfolgende Bindungsassays weiter charakterisieren zu können, mussten diese exprimiert werden (IV.2.4). Das Bakterienwachstum wurde protokolliert und die Proteinexpression vor und nach Inkubation mit IPTG über ein SDS Polyacrylamid-Gel verifiziert (IV.2.1).
Es wurde 100 ml Kulturen verwendet, die bei 32°C im Rotationsständer gehalten wurden (Abb. 2). Die Induktion der Proteinexpression erfolgte ungefähr bei der halbmaximalen optischen Dichte des Kulturwachstums mit 0.5 mM IPTG.

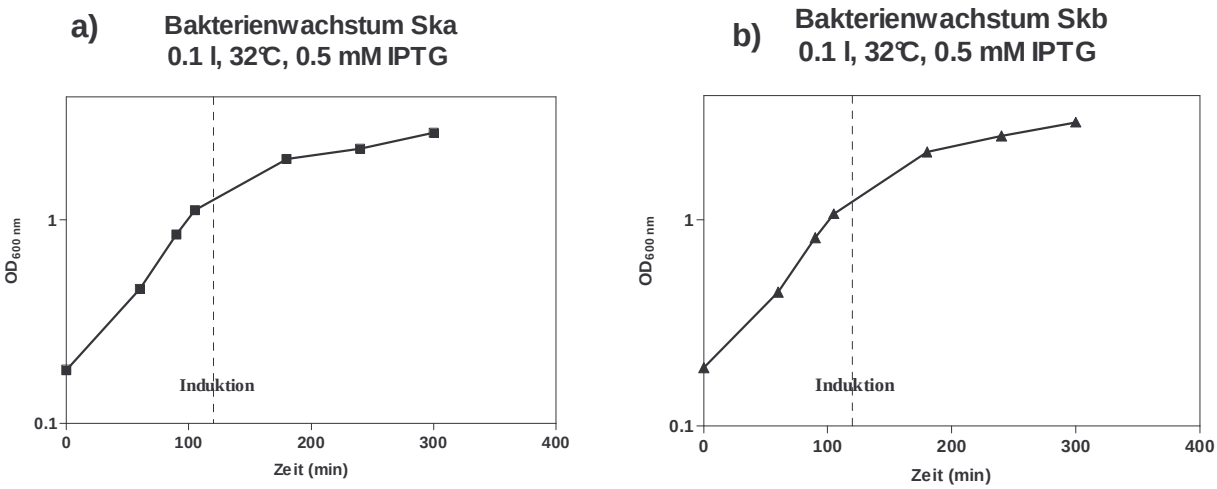



**Abb. 2a+b: Bakterienwachstum von E.coli pPREP4 M15 mit KcsA-SKa (a) und KcsA-SKb (b).**
Gezeigt ist die optische Dichte bei 600 nm $OD_{600}$ gegen die Brutzeit.

Das maximale Bakterienwachstum war bei einer $OD_{600}$ von 2,674 für KcsA-Ska bzw. von 2,964 für KcsA-Skb erreicht.

Zum Vergleich ist in der Abbildung 3 das Bakterienwachstum einer 1 l Kultur bei 30°C von KcsA-Ska-F103L, pQE32, in E.coli pPREP4 M15 dargestellt. Das maximale Bakterienwachstum war bei einer $OD_{600}$ von 1,205 erreicht.

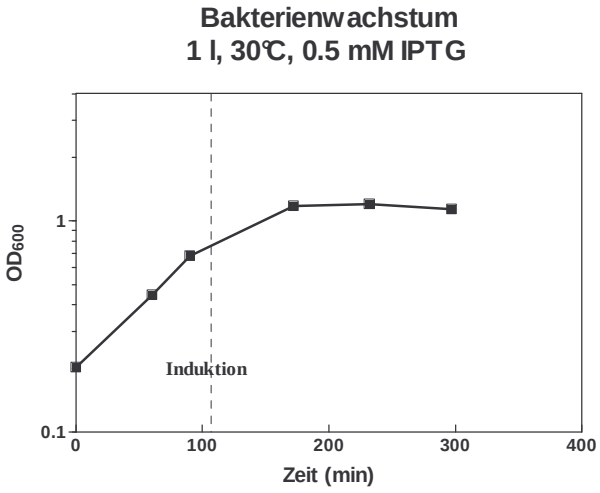



**Abb. 3: Bakterienwachstum von E.coli pPREP4 M15 mit der Chimäre KcsA-SKa-F103L.**

Abbildung 4 zeigt ein Coomassie gefärbtes SDS PAGE elektophoretisch aufgetrennten Gesamtproteins aus E.coli M15, Klon pQE32 KcsA-Ska& -Skb. Die relative Größe der Proteine wurde anhand des molekularen Markers (MW) bestimmt. Es konnte festgestellt werden, dass die Menge des exprimierten Proteins über die Zeit zunimmt und vor der eingesetzten Transkription ausgelöst durch den synthetischen Induktor IPTG zum Zeitpunkt 0h noch vollständig fehlte. Es ließ sich eine Größe der Kanalproteine von ~19 kDa feststellen, was der zuvor errechneten Größe aus der Molekülstruktur von KcsA entsprach.

Die KcsA-Chimären wurden nach der Expression an $Ni^{2+}$NTA-Agarose aufgereinigt (V.2.3).

**Abb. 4)**

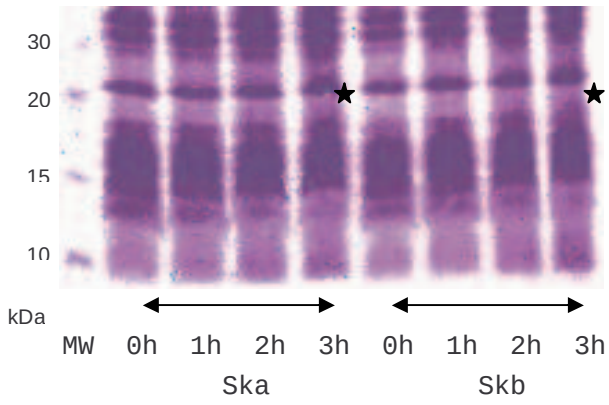



**Abb. 4: Coomassie-Blue gefärbtes SDS Polyacrylamid-Gel (Trenngel 15%, Sammelgel 3%) zeigt die Expression der Kanalproteine KcsA-Ska & -Skb nach Induktion mit IPTG.** Abkürzungen: MW= BenchMark® Molekular Weight Marker, 0h= Rohprotein aus pQE32 KcsA-Ska & -Skb vor Induktion, 1h, 2h, 3h nach Induktion. ★: Banden der Kanalproteine.

## 2.2 Expression und Elution der Chimäre IV in pQE32 und pQE70 sowie des Wildtyp KcsA-Kanals in pQE32

Die Chimäre IV in den Vektoren pQE32 und pQE70 wurde in einer 8 Liter Bakterienkultur E.coli pPREP4 M15 herangezogen, der Wildtyp KcsA-Kanal in einer 0.5 Liter Kultur im Vektor pQE32 (IV.2.4). Es wurde bei der halbmaximalen $OD_{600}$ induziert und bis zum Erreichen der Plateauphase exprimiert.

Für die Chimäre IV im Vektor pQE32 und pQE70 sowie für den Wildtyp-Kanal KcsA im Vektor pQE32 konnte ein ähnliches Bakterienwachstum und eine ähnliche Expressionskinetik des Kanalproteins in E.coli pPREP4 M15 festgestellt werden, wie auch für KcsA-Ska & -Skb in pQE32.

Die Abbildung 5 zeigt das Bakterienwachstum der Kultur E.coli pPREP4 M15 von der Chimäre IV in pQE32 und pQE70. Ebenfalls ist das Wachstum der Kultur von Wildtyp-Kanal KcsA in pQE32 aufgeführt. Das Wachstum erfolgte bei 30°C und die Induktion mit 0,5 mM IPTG. Es konnte ein exponentielles Wachstum der Bakterienkultur festgestellt werden. Maximales Wachstum waren für Chimäre IV in pQE32 bei einer optischen Dichte $OD_{600}$ von 1,62, für Chimäre IV in pQE70 bei 2,05 und für KcsA in pQE32 bei 0,94 erreicht.

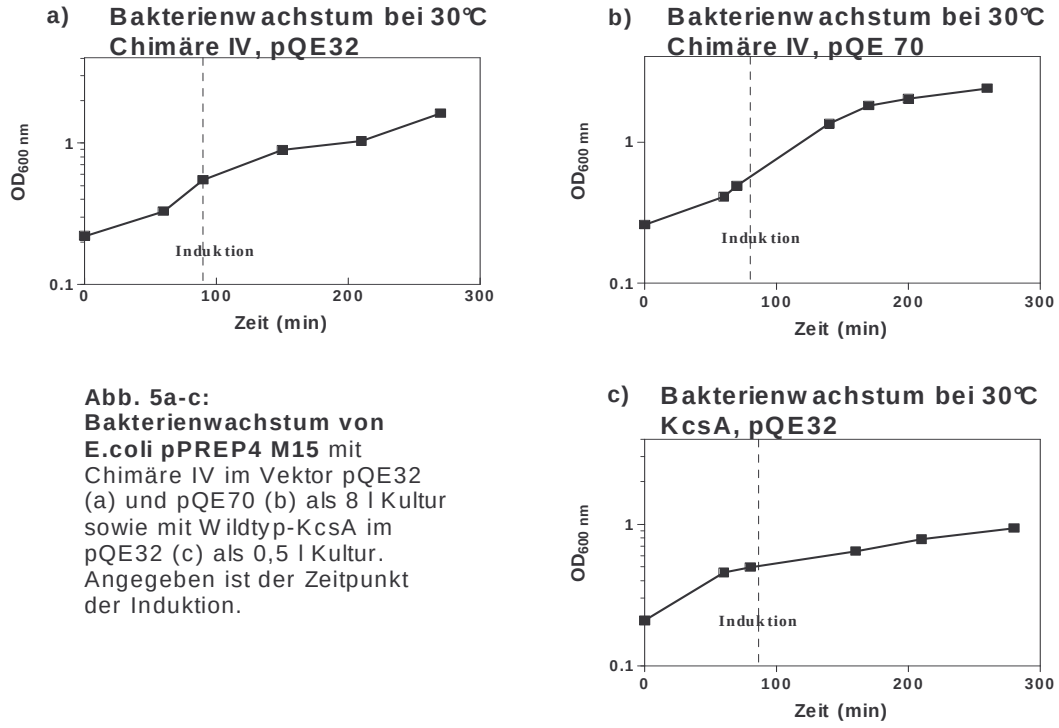



**Abb. 5a-c:**
**Bakterienwachstum von E.coli pPREP4 M15** mit Chimäre IV im Vektor pQE32 (a) und pQE70 (b) als 8 l Kultur sowie mit Wildtyp-KcsA im pQE32 (c) als 0,5 l Kultur. Angegeben ist der Zeitpunkt der Induktion.

Die Expression der Kanalproteine wurde im 15% SDS-PAGE verifiziert (Abb. 6). 1 ml der Bakterienkultur wurde nach entsprechender Zeit nach Induktion der Kultur entnommen, 5 min. bei 95°C denaturiert und als Gesamtprotein aufgetragen. Es ließ sich eine zunehmende Akkumulation des Kanalproteins in der Zelle während der Inkubation feststellen, die nach einer Induktionszeit von 3 h im SDS-PAGE bei ~19 kDa deutlich sichtbar war. (Abb. 6a+b: ★).

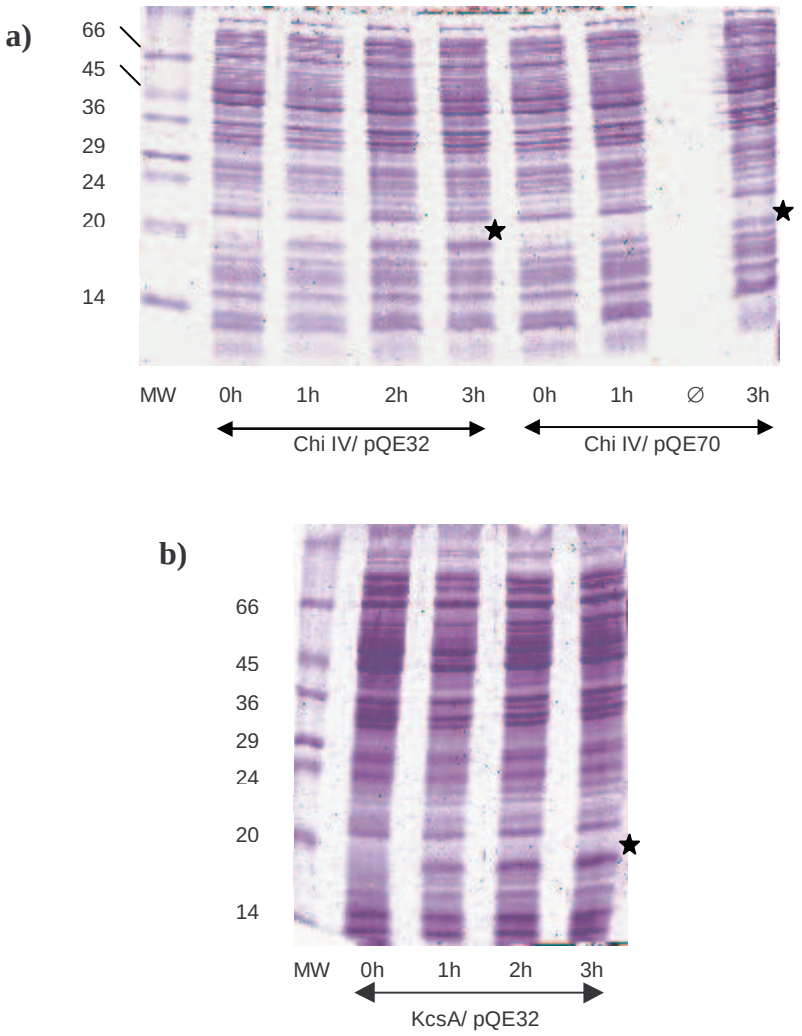



**Abb. 6a+b: 15% SDS PAGE des nach 0h, 1h, 2h und 3h nach Induktion mit IPTG aufgetragenen Gesamtproteins aus 1 ml der Bakterienkultur** E.coli pPREP4 M15. a: Kultur mit Chimäre IV im Vektor pQE32 und Vektor pQE70. b: Kultur mit Wildtyp-KcsA Insert im Vektor pQE32. MW: molekularer Gewichtsmarker mit Gewichtsgrößen in kDa. ★: Banden der Kanalproteine.

## 2.3 Elutionsprofile und SDS-Page der aufgereinigten Proteine

Da die exprimierten Kanalproteine in der inneren Bakterienmembran eingelagert waren, wurden die Zellen in der French Press (IV.2.5) aufgeschlossen und die Proteine aus den Bakterienmembranen mit DM herausgelöst. Das Proteinlysat wurde mit $Ni^{2+}$NTA Agarose inkubiert. Die Inkubation mit $Ni^{2+}$NTA Agarose bewirkte eine selektive Bindung der Proteine und ermöglichte deren Aufreinigung. Die Kanalproteine wurden mit Imidazol von der $Ni^{2+}$NTA Agarose eluiert und in Fraktionen gesammelt (IV.2.6).

Die Abbildungen 7a-d zeigen die Elutionsprofile der gesammelten Fraktionen. Es wurde die optische Dichte bei 280 nm gegen den Elutionspuffer gemessen. Wegen der Menge an Protein in einer 8 Liter Kultur im Falle der Chimäre IV wurden 2 Säulen zur Elution verwendet. Es zeigte sich, dass das gesamte Protein innerhalb der ersten 10- 15 ml von der $Ni^{2+}$NTA Agarose eluiert worden war.
In Abhängigkeit von der Größe der Bakterienkultur, in der exprimiert wurde, zeigten sich bei der Elution der Kanalproteine Chimäre IV in pQE32 und pQE70 sowie KcsA in pQE32 ähnliche Elutionsprofile. Die Proteinausbeuten bei der Expression lagen für die Chimäre IV in pQE32 bei 10 mg Protein und in pQE70 bei 4 mg Protein in einer 8 L Bakterienkultur, für KcsA-Wildtyp in pQE32 bei 0,27 mg in einer 0,5 L Kultur. KcsA-Ska-F103L zeigte auf Grund seiner geringen Expressionsrate ein kaum messbares Elutionsprofil (Abb. 7d). Hier betrug die Proteinausbeute nur 0,028 mg in einer 1 L Kultur E. coli pPREP4 M15.
Zur weiteren Verarbeitung wurden die Volumenfraktionen verwendet, die eine $OD_{280nm}$ von über 0,02 hatten, nach der Elution der KcsA-Ska-F103 Chimäre wurden auf Grund der geringen Expressionsrate Volumenfraktionen gesammelt, die eine $OD_{280nm}$ von über 0,002 hatten. Die vereinten Volumenfraktionen wurden in der Filtrationszentrifugation eingeengt (IV.2.7.1) und das zur Elution verwendete Imidazol in der FPLC (IV.2.7.2) eliminiert.

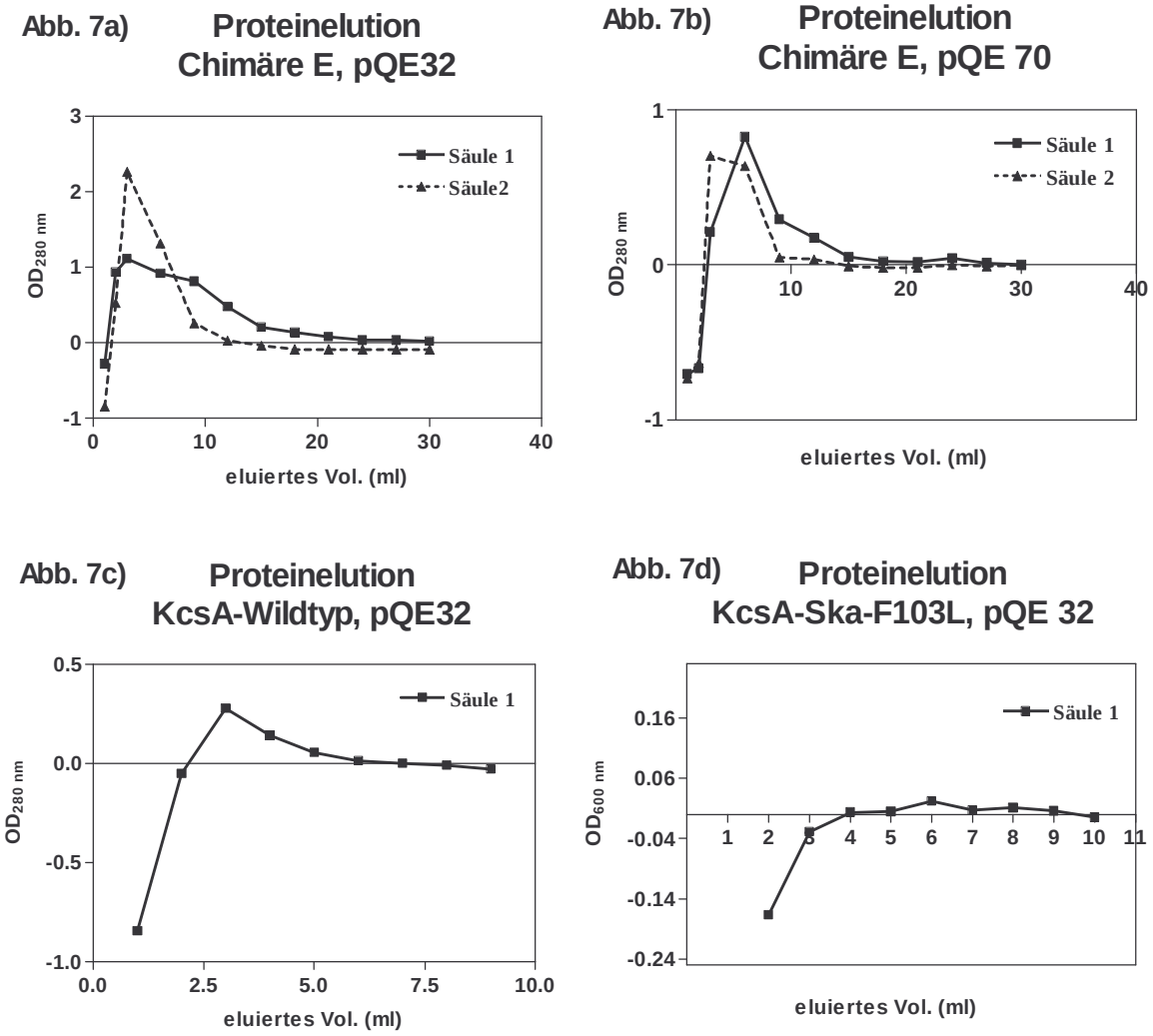



**Abb. 7 a-d: Elutionsprofile der von der $Ni^{2+}$NTA Agarose eluierten Kanalproteine.** Es wurde die optische Dichte bei 280 nm gegen das insgesamt eluierte Volumen in ml aufgetragen. a & b: Chimäre IV in pQE32(a) und pQE70 (b): Elutionsprofile von jeweils 2 Säulen; c: KcsA-Wildtyp im Vektor pQE32; d: KcsA-SKa-F103L im Vektor pQE32.

Abbildung 8 zeigt eine FPLC des zuvor mit Imidazol von der $Ni^{2+}$NTA-Agarose eluierten Kanalproteins KcsA. Es wurden laufend die optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm gemessen. Der erste Ausschlag zwischen den Fraktionen 2 und 4 Minuten wurde durch Imidazol verursacht. Diese Fraktionen wurden verworfen. Der zweite Ausschlag wurde durch das Kanalprotein verursacht, das zwischen der 6. und 8. Minute von der Säule eluiert wurde. Diese Fraktionen wurden gesammelt und mittels Zentrifugationsfiltration (IV.2.7.1) eingeengt.

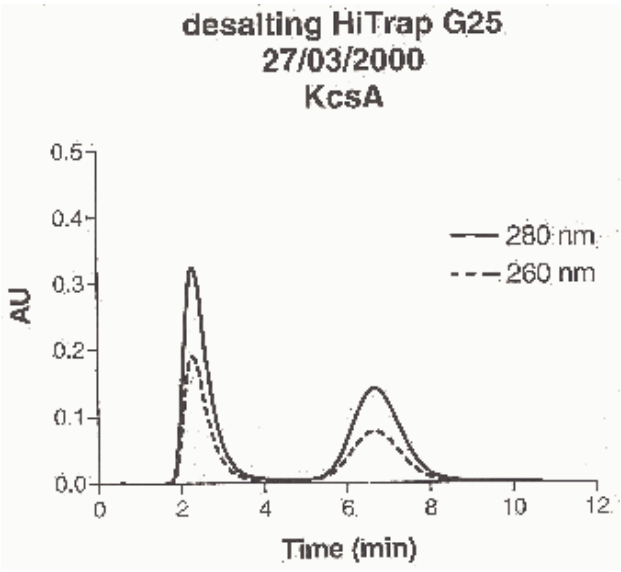



**Abb. 8: FPLC der mit Imidazol eluierten proteinhaltigen Fraktionen.** Es wurde laufend die Absorptionsrate (AU) bei 280 nm und 260 nm gemessen und gegen die Durchlaufzeit aufgetragen.

Die Abbildung 9a zeigt das gereinigte Chi IV Protein, das zuvor entsalzt und eingeengt wurde (IV.2.7), auf einem SDS-PAGE (IV.2.1). Die Kanalchimäre wurde sowohl im nativen Zustand (U= unboiled) als auch nach 5 min Erhitzen bei 95°C im denaturierten Zustand (B= boiled) in Laemmli-Puffer aufgenommen und auf das Gel aufgetragen.
Es zeigte sich, dass das unerhitzte Protein eine Größe von ca. 70 kDa hatte, während das erhitzte mit einer Bande bei ca. 19 kDa sehr viel kleiner war. Das ließ darauf schließen, dass das Kanalprotein in aufgereinigter Form als Tetramer vorlag und beim Erhitzen in seine Monomere zerfallen war, die sich im Gel als Bande bei ca. 19 kDa verdeutlichten. Für Wildtyp-Kanal KcsA ließ sich ähnliches feststellen.

Nach einer Gelelektrophorese im SDS-PAGE (IV.2.1) vom aufgereinigten Kanalprotein KcsA-Ska-F103L zeigten sich Banden an gleicher Stelle bei ca. 19 kDa in der erhitzten und unerhitzten Probe (Abb. 9b). Hieraus ließ sich folgern, dass das Kanalprotein in der aufgereinigten Form außerhalb der Bakterienmembran von vorne herein als Monomer vorlag und keine stabile tetramere Struktur ausbildete.

**Abb. 9a)**

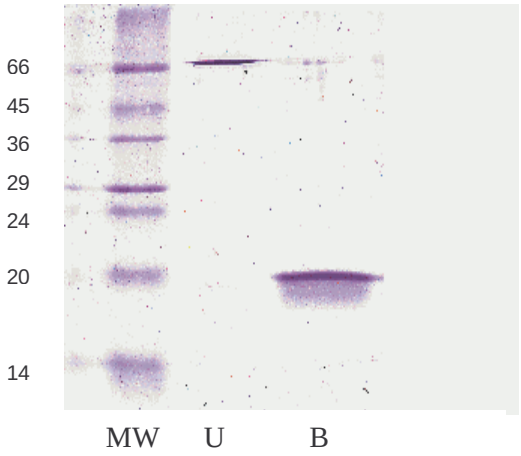



**Abb. 9b)**

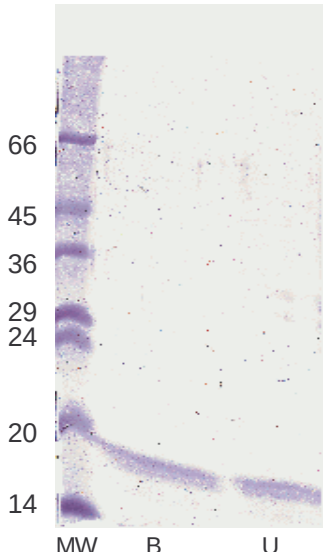



**Abb. 9a+b: 15% SDS PAGE der aufgereinigten Kanalproteine KcsA-Kv1.3 Chimäre IV (a) und KcsA-Ska-F103L (b) transformiert im Vektor pQE32.** U: nativ (unboiled); B: denaturiert (boiled); MW: molekularer Gewichtsmarker.

## 3. Screening der Phagen-Peptidbibliothek gegen Chimäre IV und Wildtyp-KcsA in drei Selektionsrunden

Zur Identifikation charakteristischer Bindungsstellen in der Porenregion der Chimäre IV wurde das Kanalprotein mit einer Phagenbibliothek inkubiert (IV.2.8.1), deren Phagen sich an einer definierten Stelle des Mantelproteins mit einer Sequenz von sieben aufeinanderfolgenden Aminosäuren unterschieden. In der Bibliothek waren alle möglichen Kombinationen dieser Sequenz mehrfach vorhanden. Um unspezifisch an das Äußere des Kanals, an die magnetische $Ni^{2+}$NTA Agarose, auf der der Kanal mit seiner Histidin-Domäne immobilisiert war (IV.2.6) oder an die Wand des Reaktionsgefäßes bindende Phagen zu eliminieren, wurde die Phagenbibliothek in einer der drei Biopanning-Runden mit an $Ni^{2+}$NTA Agarose gebundenem Wildtyp-Kanal KcsA inkubiert. Der Überstand wurde dann mit der Chimäre IV inkubiert und Phagen aus der Porenregion mit 100 nM des Kanalblockers Kaliotoxion (KTX) eluiert, die Phagen-DNA isoliert (IV.1.2.3) und sequenziert. Parallel wurden in einer Versuchsreihe

mit drei Selektionsrunden Phagen von KcsA Wildtyp-Kanal mit 100 nM Kaliotoxin eluiert und amplifiziert.

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Variable Region (X): | | | | | | | | | | | |
| S | A | C | X | X | X | X | X | X | X | C | G |
| Eluiert von KcsA: | | | | | | | | | | | |
| 1) | | | S | T | A | T | F | N | Q | | |
| 2) | | | Q | S | Q | L | A | F | R | | |
| Eluiert von Chimäre IV: | | | | | | | | | | | |
| 1) | | | S | W | M | H | Y | G | T | | |
| 2) | | | A | x | P | x | G | A | P | | |
| 3) | | | L | R | G | L | T | P | P | | |
| 4) | | | x | x | R | x | L | I | x | | |
| 5) | | | Q | Q | P | L | A | N | K | | |

**Tab. 4: Liste sequenzierter Phagen**, dargestellt die variable Region des Mantelproteins als Aminosäuresequenz (x= nach der Sequenzierung uneindeutige Aminosäure).

Die Tabelle 4 zeigt die Protein-Sequenz eluierter Phagen nach drei Runden Biopanning. Zur Interpretation der Sequenzen war es wichtig darauf zu achten, dass die Sequenzen außerhalb der variablen Region identisch sind. Insbesondere war hierbei auf die Region außerhalb der Schnittstellen für die Endonukleasen EagI und KpnI, die dafür benutzt wurden, um die variable Region in die Phagen-DNA einzufügen, zu achten. Ebenfalls durften die Codon-Tripletts in der variablen Region in 5´→3´-Richtung abgelesen auf dem führenden Strang an der 3. Stelle nur Guanin und Thymin enthalten, da es sich sonst um nicht aus der ursprünglichen Bibliothek stammende Wildtyp-Phagen handeln würde.

In einer ersten Versuchsreihe konnte keine konsensuelle Proteinsequenz nach drei Runden Biopanning isoliert werden. Bei vielen sequenzierten Phagen-Plaques handelte es sich lediglich um Wildtyp-Phagen, die nicht aus der ursprünglichen Bibliothek stammen. Bei der Titration der Phagen wurde ein relativ starkes Hintergrundrauschen

von unspezifischen Phagen festgestellt, das sich darin äußerte, daß die Anzahl der Phagenplaques auch in höheren Verdünnungen der Verdünnungsreihe nicht linear, wenn überhaupt, abnahm. Auch waren die Phagen-Plaques randunscharf und blaß. Zur Kontrolle der Bindungsstabilität des Kanalproteins an der magnetischen $Ni^{2+}$NTA-Agarose während der Wasch- und Elutionsschritte wurden in Vorversuchen die Waschschritte gesammelt und zusammen mit dem mit Imidazol von der $Ni^{2+}$NTA-Agarose eluierten Kanalprotein (IV.2.6) im Dot Blot verglichen (IV.2.3.1b-3).

Da der Komplex aus magnetischer $Ni^{2+}$NTA-Agarose Sonde und KcsA-Kv1.3 Chimäre IV während der Versuche im Phage-Display häufigen Waschschritten und Medienwechseln unterzogen war, sollte in einem Vorversuch die Stabilität dieses Komplexes in den während des Phage-Display verwendeten Puffern überprüft werden. Ebenso sollte festgestellt werden, ob eine längere Inkubationszeit der magnetischen $Ni^{2+}$NTA-Agarose Sonde mit der Chimäre IV einen stabileren Komplex ergeben würde.
Die in den Abbildungen 10a und 10b dargestellten Dotblots zeigen das Bindungsverhalten von Chimäre IV und KcsA an der magnetischen $Ni^{2+}$NTA Agarose-Sonde. Es wurden 30 µg Kanalprotein mit 100 µl der Suspension mit magnetischer $Ni^{2+}$NTA-Agarose Sonde über Nacht (10a: A1-A6) und für 1,5 h (10b: B1-B6) in 230 µl BBK I 20 inkubiert. Nach Inkubation wurden 100 µl des Überstandes im Dot Blot gemessen (A2 bzw. B2). Ebenso wurden 100 µl des Überstandes vom 1. (A3 bzw. B3) und 3. (A4 bzw. B4) Waschschritt mit 300 µl BBK I 20 im Dot Blot untersucht. Zuletzt wurde die an der $Ni^{2+}$NTA-Agarose Sonde gebundene Chimäre IV mit 100 µl BBK I 250 eluiert und im Dot Blot gemessen (A5 bzw. B5).
Es ließ sich feststellen, dass es keinen wesentlichen Unterschied nach Inkubation für 1,5 h und über Nacht gab, eine Inkubation für 1,5 h war ausreichend. Es konnte gezeigt werden, dass das Signal mit der häufigkeit der Waschschritte abnahm (A2-A4 bzw. B2-B4). Trotzdem ließ sich mit 250 mM Imidazol eine deutliche Menge Chimäre IV von der $Ni^{2+}$NTA-Agarose Sonde eluieren (A5 bzw. B5). Die Chimäre IV blieb also zum Teil in dem im Phage-Display verwendeten Waschpuffer stabil an der magnetischen $Ni^{2+}$NTA-Agarose Sonde gebunden. Diese Eigenschaften sollten auch für den KcsA-Kanal (Abb. 10b: D1-D3) überprüft und mit der Chimäre IV (Abb. 10b: C1-C3) verglichen werden. Hier wurde nur die Elutionsfraktion (C2 bzw. D2) nach den 3 Waschschritten im Dot Blot untersucht. Der KcsA-Kanal blieb ebenso stabil an der

$Ni^{2+}$NTA-Agarose Sonde im Waschpuffer gebunden, wie es auch bei der Chimäre IV der Fall war.

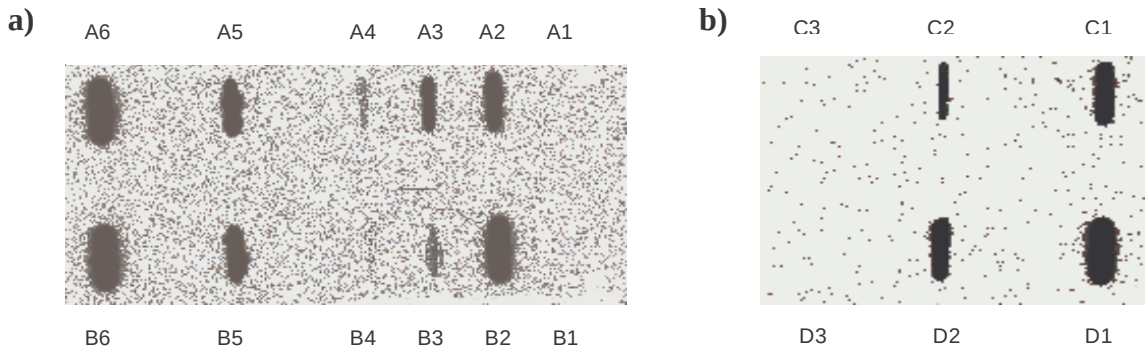



**Abb. 10a+b: Dot Blots von Magnetischer $Ni^{2+}$NTA-Agarose gewaschener und eluierter Kanalproteine Chimäre IV und KcsA.**
**Abb. 10a:** Dot Blot verschiedener Waschgänge und eluierten Proteins Chimäre IV nach verschiedenen Inkubationszeiten des Proteins mit der magnetischen $Ni^{2+}$NTA-Agarose:
A: Inkubation über Nacht, B: Inkubation für 1,5 h: 1: neg. Kontrolle; 2: Überstand nach Inkubation; 3: 1.Waschgang; 4: 3.Waschgang; 5: Elution; 6: pos. Kontrolle.
**Abb. 10b:** Dot Blots der Elutionen von Chimäre IV und KcsA von der magnetischen $Ni^{2+}$NTA-Agarose nach 3 Waschgängen: C: Chimäre IV; D: KcsA: 1: pos. Kontrolle; 2: Elution; 3: neg. Kontrolle.

Im Rahmen der Versuche konnte keine sich wiederholende Heptapeptidsequenz durch das Screening von Phagen-Peptidbibliotheken (Phage-Display) aus der Bindung an der Porenregion der Chimäre IV isoliert werden. Ob eine der isolierten Heptapeptide tatsächlich aus der Bindung mit der Porenregion von Chimäre IV stammte, ließ sich nur sehr aufwendig nachweisen. In vielen Vorveruchen hätte der ideale Phagentiter zur Inkubation mit der Chimäre sowie zur Transduktion mit dem E.coli ER2738 Bakterienstamm ermittelt werden müssen, um die unspezifische Bindung von Phagen möglichst gering zu halten

Deshalb wurden im weiteren Verlauf zur einfacheren Charakterisierung und Identifikation wichtiger Bindungsstellen in der Porenregion der Kanalproteine auf bekannte Liganden zurückgegriffen. Es wurden gezielt einzelne Aminosäuren der Porenregion verändert und durch Bindungsassays deren Rolle in der Liganden-Rezeptorinteraktion untersucht.

# 4. Bindungsassays

## 4.1 Kompetitive Bindungsexperimente

In kompetitiven Bindungsexperimenten wurde die Bindungsaffinität eines Liganden an einem Rezeptor untersucht. Hierzu wurde der Rezeptor, das Kanalprotein, mit einem radioaktiv markierten Liganden einer festen Konzentration inkubiert. Gleichzeitig wurde der Rezeptor mit aufsteigenden Konzentrationen unmarkierten Liganden, welcher mit dem Radioliganden um den Rezeptor konkurriert, inkubiert. Nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichts wurde das Kanalprotein durch Filtration mit dem GF/C-Filter (Whatman) isoliert und mit 3x 4 ml Waschpuffer gewaschen Die verbliebene Radioaktivität des gebundenen Radioliganden in den verschiedenen Konzentrationen unmarkierten Toxins wurde im γ-Zähler gemessen (IV.2.8.2b). Es ließ sich nach der folgenden Gleichung die spezifische Bindung (B) des radioaktiven Liganden am Rezeptor als Funktion der logarithmischen Konzentration des unmarkierten Liganden (Log [Toxin]) beschreiben [69]:

$$B = B_{min} + \frac{B_{max} - B_{min}}{1 + 10^{\text{Log [Toxin]} - \text{Log IC50}}}$$

($B_{max}$: totale Bindung; $B_{min}$: unspezifische Bindung; B: spezifische Bindung; [Toxin]: Konzentration des unmarkierten Liganden)

Aus der Gleichung ließ sich die $IC_{50}$ (inhibitory concentration 50%) errechnen, die Konzentration nicht markierten Toxins als Kompetitor, bei der nur noch die Hälfte aller Rezeptoren mit radioaktiven Liganden besetzt waren. In homologen Bindungsexperimenten haben Ligand und Kompetitor das gleiche Bindungsverhalten zum Rezeptor. Damit ließ sich die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante, Kd, direkt aus der $IC_{50}$ nach Kd= $IC_{50}$– [Konzentration radioaktiver Ligand im Experiment] berechnen und an verschiedenen Kanalprotein-Chimären vergleichen.

### 4.1.1 Kompetitives Bindungsverhalten zwischen $HgTX_1$ und KcsA-Kv1.1 bzw. KcsA-Kv1.1-L81M Chimären

Es wurden 1:500 Verdünnungen der Bakterienmembranen von E. coli pPREP4 M15 verwendet, in denen die Chimären KcsA-Kv1.1 und KcsA-Kv1.1-L81M exprimiert wurden. Die Membranen wurden mit 0,5 nM $^{125}$I-$HgTX_1$-A19Y/Y37F und aufsteigenden Verdünnungen von $10^{-13}$ M bis $10^{-6}$ M (Abb. 11) unmarkierten Toxins für zwei Stunden bis zum Ende des Reaktionsgleichgewichts in 200 µl Volumina inkubiert (IV.2.8.2b). Nach Filtration und Waschung wurden die Filter im γ-Zähler ausgewertet. Es wurden Bakterienmembranen verwendet, da das aufgereinigte Kanalprotein als Monomer vorliegt und so kein Toxin binden kann.

Die Chimäre KcsA-Kv1.1 zeigte eine $IC_{50}$ von 0,6 nM, während die Chimäre KcsA-Kv1.1-L81M mit einer Mutation eines Leucins zu einem Methionin an Position 81 eine $IC_{50}$ von 28,9 nM aufwies. Die Chimäre KcsA-Kv1.1 ohne die Substitution L81M wies eine ca. 48-fach hohere Affinität zum Toxin auf, als die gleiche Chimäre mit der Substitution. Der t-Test ergab angewendet auf die normalisierten Daten einen P-Wert von <0,0001. Der Differenzmittelwert lag bei 13,6, das 95%-Konfidenzintervall zwischen 9,60 und 17,59.

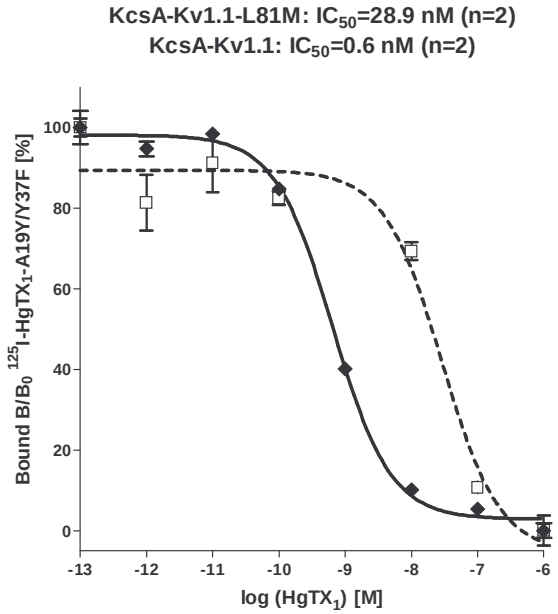



**Abb. 11 zeigt die vom Ausgangswert ohne Kompetitor prozentuale Menge am Rezeptor gebundenen radioaktiven Toxins in Anhängigkeit von der Konzentration unmarkierten Toxins.** Die errechnete $IC_{50}$ für den jeweiligen Kanal ist jeweils angegeben. Werte und kompetitive Bindungskurve von KcsA-Kv1.1 (Chi XI) (◆,—) und KcsA-Kv1.1-L81M (Chi XI-L81M) (□,**- - -**).

### 4.1.2 Kompetitives Bindungsverhalten zwischen $HgTX_1$ und Chimäre IV

In 200 µl Reaktionsvolumen wurden 5 ng aufgereinigte Chimäre IV mit 0,25 nM $^{125}$I-$HgTX_1$-A19Y/Y37F und aufsteigenden Konzentrationen von $10^{-13}$ M bis $10^{-7}$ M unmarkierten Toxins $HgTX_1$ für 2h bei Raumtemperatur inkubiert (IV.2.8.2b). Nach Filtration und Waschung wurden die Filter im γ-Zähler ausgewertet (Abb. 12).

Die KcsA-Kv1.3 Chimäre IV (V.1.1: Tab. 1) wies mit einer $IC_{50}$ von 0,23 nM eine ähnliche Größenordnung auf, wie die aus Chimäre IV abgeleitete Chimäre VIII-G56T (vgl. V.4.1.3) mit einer $IC_{50}$ von 0,16 nM (Abb. 13).

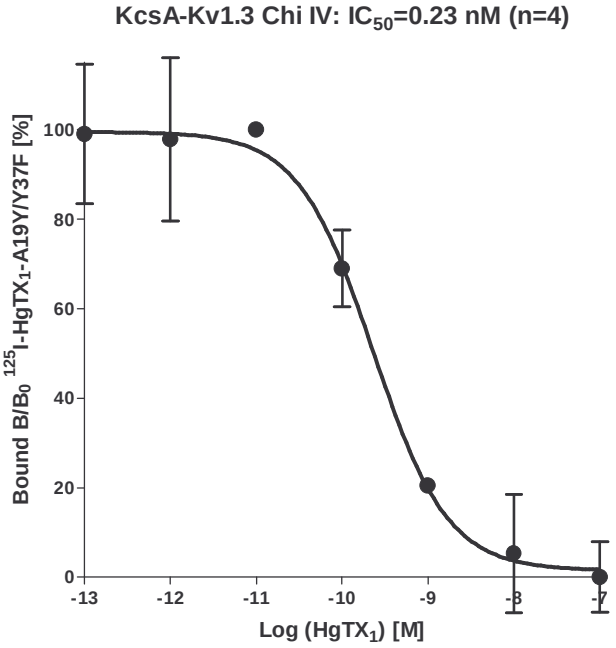



**Abb. 12: Es wird die prozentuale Besetzung der Rezeptoren mit radioaktivem Toxin in Abhängigkeit zur Konzentration nicht radioaktiven Toxins gezeigt.** Die $IC_{50}$ ist angegeben.

### 4.1.3 Kompetitives Bindungsverhalten zwischen $HgTX_1$ und Bakterienmembranen mit Chimäre VIII bzw. Chimäre VIII-G56T

Da die KcsA-Kv1.3 Chimären VIII und VIII-G56T aufgereinigt als Monomere vorlagen, wurden für die Bindungsassays Bakterienmembranen verwendet.

Die Versuche wurden in 250 µl, 500 µl und 1 ml Reaktionsvolumina mit einer Verdünnung von 1:500 der Bakterienmembranen von E. coli pPREP4 M15, in denen die KcsA-Kv1.3 Chimären VIII und VIII-G56T exprimiert wurden, durchgeführt. Die Membranen wurden mit 10 pM $^{125}$I-$HgTX_1$ und entsprechenden Verdünnungen nicht radioaktiven Kompetitors $HgTX_1$ für 2 h bei RT inkubiert (IV.2.8.2b). Nach Filtration und Waschung der Membranen wurden die Filter im γ-Zähler gemessen.

Für die in Abbildung 13 dargestellten Kurven ergab sich im Durchschnitt eine $IC_{50}$ von 2,97 nM für die Chimäre VIII und 0,16 nM für die Chimäre VIII-G56T. Somit zeigte die Chimäre VIII mit der Substitution G56T eine 18,6-fache Steigerung in der Affinität gegenüber der Chimäre VIII.

Ein gepaarter t-Test der normalisierten Daten zeigte einen P-Wert von 0,0006. Der Differenzmittelwert lag bei 15,82. Das 95%-Konfidenzintervall lag bei 8,160 bis 23,47.

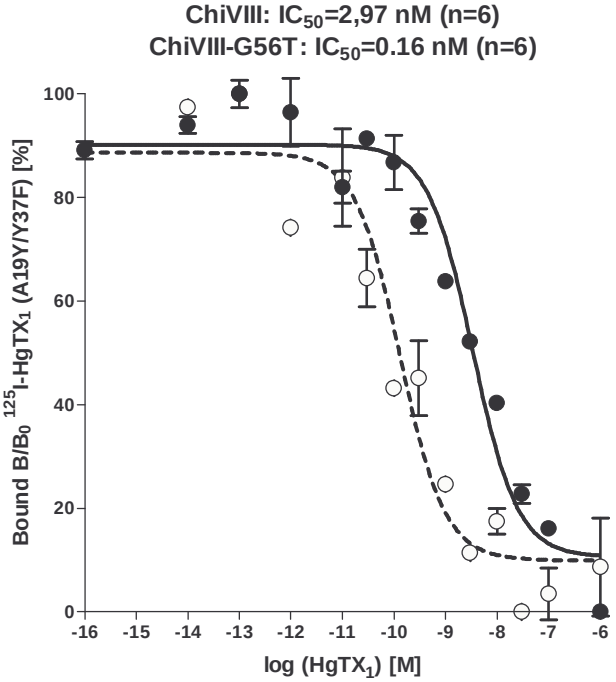



**Abb. 13: Prozentuale Besetzung der Rezeptoren mit radioaktiven Liganden in Abhängigkeit von unmarkiertem Kompetitor.** Im Vergleich: Bindungskurven und $IC_{50}$ von Chi VIII und Chi VIII-G56T. Werte und kompetitive Bindungskurve von Chimäre VIII (●,—) und Chimäre VIII-G56T (○,- - -).

### 4.1.4 Kompetitives Bindungsverhalten zwischen KTX und Bakterienmembranen mit Chimäre VIII und Chimäre VIII-G56T

In Reaktionsvolumina von 250 µl wurden Bakterienmembranen von E. coli pPREP4 M15 verwendet, in denen die KcsA-Kv1.3 Chimären VIII und VIII-G56T exprimiert wurden. Die Membranverdünnungen betrugen 1:500 und wurden 2 h mit 0,2 nM $^{125}$I-KTX und aufsteigenden Konzentrationen des Kompetitors KTX von $10^{-14}$ M bis $10^{-6}$ M inkubiert (IV.2.8.2b). Nach Filtration und Waschung wurden die Filter in γ-Zähler gemessen

Für die Chimäre VIII ergab sich eine $IC_{50}$ von 5,81 pM, für Chimäre VIII-G56T ein nahezu gleicher Wert von 6,08 pM (Abb. 14). Ein gepaarter t-Test mit normalisierten Daten ergab einen P-Wert <0,0001. Der Differenzmittelwert lag bei 0,644, das 95%-Konfidenzintervall lag zwischen 0,418 und 0,870.

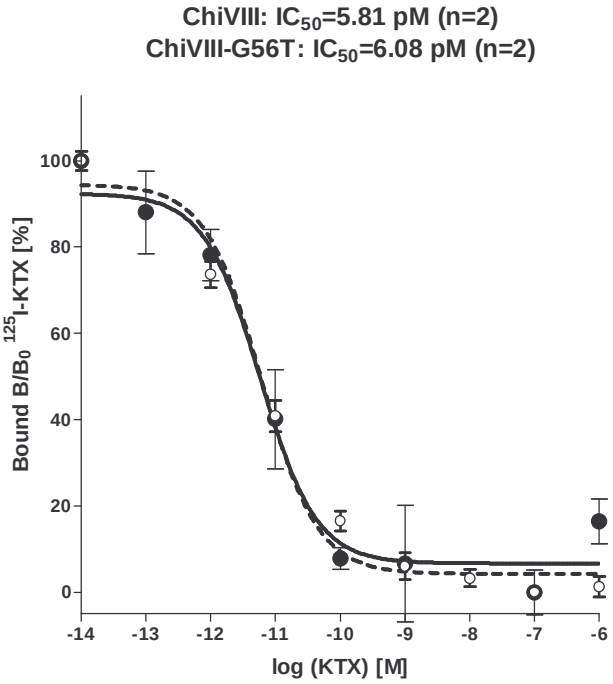



**Abb. 14: Prozentuale Besetzung des Rezeptors mit radioaktivem Liganden $^{125}$I-KTX in Abhängigkeit vom Kompetitor KTX an Chimären VIII und VIII-G56T.** Werte und kompetitive Bindungskurve von Chimäre VIII (●,—) und Chimäre VIII-G56T (○,**- - -**).

## 4.2 Dissoziationsrate $k_{off}$ für HgTX von Bakterienmembranen mit Chimäre VIII und Chimäre VIII-G56T

Es wurde die Dissoziationsrate des radioaktiven Liganden von den Rezeptoren KcsA-Kv1.3 Chimäre VIII und Chimäre VIII-G56T in Anwesenheit eines Überschusses an unmarkiertem Liganden bestimmt (IV.2.8.2c). Hierzu wurden 1 ml Reaktionsansätze mit Membranverdünnungen von E. coli pPREP4 M15 von 1:500 und 1:1000 verwendet, in denen die KcsA-Kv1.3 Chimären VIII und VIII-G56T exprimiert wurden. Die Membranen wurden über Nacht mit 10 pM $^{125}$I-HgTX$_1$ inkubiert und dann die Dissoziationsreaktion mit 50 nM HgTX$_1$ gestartet. Die Reaktion wurde nach definierten Zeitabständen durch Verdünnung mit Waschpuffer gestoppt und die gewaschenen Filter im γ-Zähler ausgewertet.

Aus der Abbildung 15 ließ sich die Dissoziationsraten-Konstante $k_{off}$ ermitteln. Aus den Versuchen ergab sich eine Dissoziationsraten-Konstante $k_{off}$ von 0,2581 min$^{-1}$ für Chimäre VIII und von 0,5128 min$^{-1}$ für Chimäre VIII-G56T. Der gepaarte t-Test ergab einen P-Wert von 0,0418. Der Differenzmittelwert lag bei 0,743, das 95%-Konfidenzintervall lag zwischen 0,037 und 1,449.

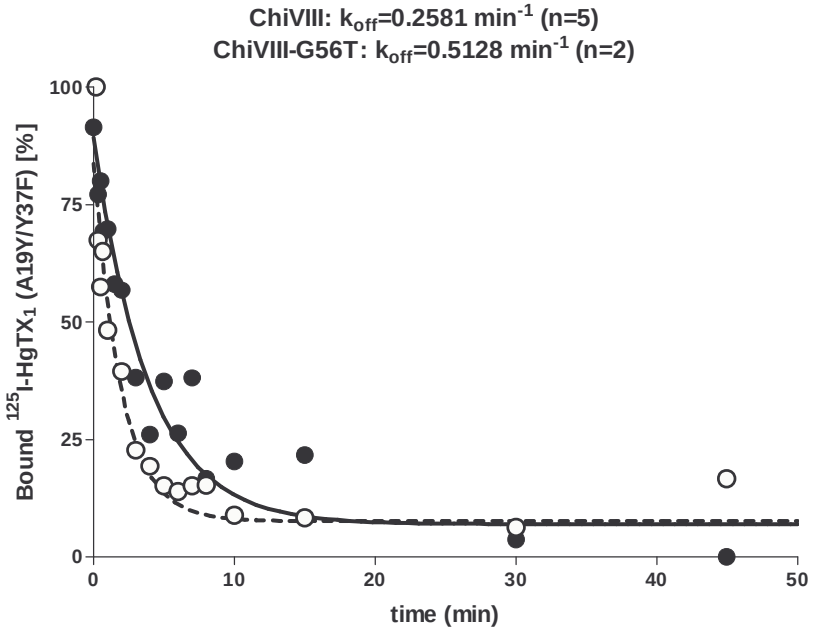



**Abb. 15: Es wird der nach bestimmten Zeitabschnitten am Rezeptor verbliebene radioaktive Ligand bei Überschuss an Kompetitor dargestellt.** Errechnet sind die Dissoziationsraten-Konstanten für Chi VIII und Chi VIII-G56T. Werte und exponentielle Zerfallskurve von Chimäre VIII (●,—) und Chimäre VIII-G56T (○,**- - -**).

## 4.3 Assoziationsrate $k_{on}$ für HgTX von Bakterienmembranen mit Chimäre VIII und Chimäre VIII-G56T

Es wurde die Assoziationsrate des radioaktiven Liganden $^{125}$I-HgTX$_1$ an die Kanalproteine KcsA-Kv1.3 Chimäre VIII und VIII-G56T bestimmt und verglichen. Hierzu wurden in Reaktionsvolumina von 1ml und 2 ml Verdünnungen der Bakterienmembranen von E. coli pPREP4 M15, in denen die Chimären exprimiert waren, von 1:1000 mit 10 pM $^{125}$I-HgTX$_1$ inkubiert und die Reaktion nach bestimmter Zeit durch Filtration und Waschung gestoppt (IV.2.8.2c). Die gewaschenen Filter wurden im γ-Zähler ausgewertet. Die observierte Assoziationsraten-Konstante, $k_{ob}$, ließ sich aus dieser Kurve ermitteln (Abb. 16). Für die Chimäre VIII ergab sich eine $k_{ob}$ von 0,2686 $M^{-1}min^{-1}$ und für die Chimäre VIII-G56T eine $k_{ob}$ von 0,5454 $M^{-1}min^{-1}$. Der t-Test ergab einen P-Wert < 0,0001. Der Differenzmittelwert lag bei 2,207 mit einem 95%-Konfidenzintervall von 1,785 bis 2,628.

Aus $k_{ob}$ konnte die unabhängige Assoziationsraten-Konstante, $k_{on}$, errechnet werden nach: $k_{on}= (k_{ob}- k_{off})/$ [Radioligand].

Somit errechnete sich für die Chi VIII ein $k_{on}$ von 1,05* $10^9$ $M^{-1}min^{-1}$ und für Chi VIII-G56T ein $k_{on}$ von 3,26* $10^9$ $M^{-1}min^{-1}$.

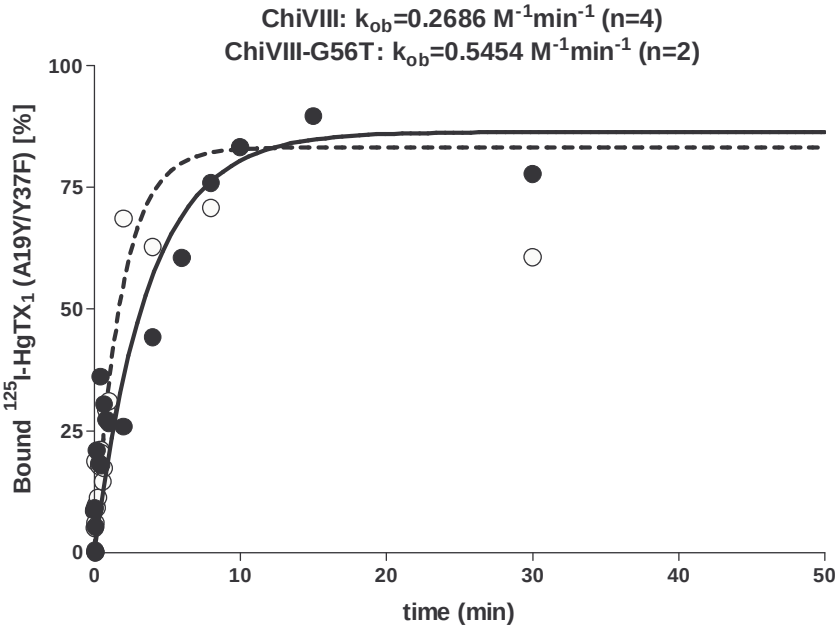



**Abb. 16: Dargestellt ist die prozentuale Bindung von $^{125}$I-HgTX$_1$ an die Chimären VIII und VIII-G56T in Abhängigkeit von der Zeit.** Werte und expotentielle Assoziationskurve von Chimäre VIII (●,—) und Chimäre VIII-G56T (○,- - -).

## 4.4 Dissoziationsrate $k_{off}$ für $^{125}$I-HgTX$_1$ von Liposomen mit Chimäre IV

Es wurde die Dissoziationsrate des radioaktiven Liganden $^{125}$I-HgTX$_1$ von der Chimäre IV in Liposomen bestimmt (IV.2.8.2c). Erneut wurden 1 ml Reaktionsansätze mit Verdünnungen der ursprünglichen Liposomensuspension von 1:4000 verwendet, die über Nacht mit 10 pM $^{125}$I-HgTX$_1$ und dann mit 50 nM HgTX$_1$ inkubiert wurden. Wieder wurde nach definierter Zeit die Reaktion durch Verdünnung mit Waschpuffer gestoppt und die verbliebene Radioaktivität in den Filtern im γ-Zähler gemessen. Es ließ sich eine Dissoziationsratenkonstante von 0.1362 min$^{-1}$ für die Chimäre IV ermitteln.
Im Vergleich zur Chimäre IV in Liposomen (Abb. 17) zeigte die Chimäre VIII in Bakterienmembranen eine 2-fach so große Dissoziationsratenkonstante, die im Falle von Chimäre VIII–G56T sogar 4-fach größer war (Abb. 15).

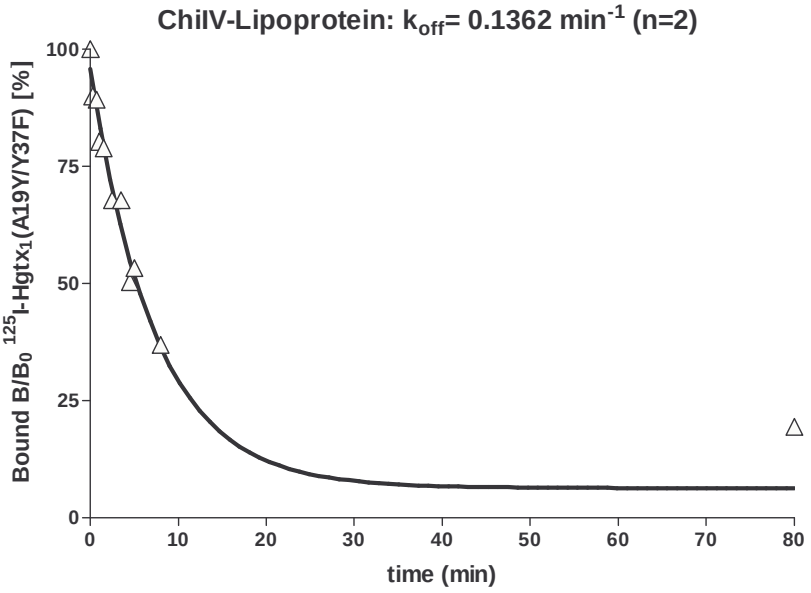



**Abb. 17: Es wird der nach bestimmten Zeitabständen am Rezeptor verbliebene radioaktive Ligand bei Überschuss an Kompetitor dargestellt.** Errechnet ist die Dissoziationsratenkonstante für Chimäre IV.

# VI Diskussion

Kaliumkanäle werden in einer hohen Bandbreite auf allen Zellen exprimiert und haben die unterschiedlichsten Aufgaben in z.B. Signaltransduktion und Stabilisierung des Membranpotentials sowie des Wasser- und Ionenhaushaltes der Zelle.
Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle Kv 1.1 und Kv 1.3 sowie der kalziumabhängige Kaliumkanal $SK_{Ca}2$ werden mehr oder weniger häufig auf humanen T-Lymphozyten oder deren Vorläuferzellen exprimiert, was sie zum Angriffspunkt der Immunsuppression der vorwiegend zellulären Abwehr macht.
Zur Identifikation charakteristischer Bindungsstrukturen können Chimären der Kanalproteine in Vektoren kloniert und so in Bakterienmembranen exprimiert werden. Dies wurde für KcsA-Ska und KcsA-Skb in dieser Arbeit exemplarisch gemacht.
Des Weiteren wurde eine Methode gesucht, mit der sich charakteristische Bindungsstellen an den Kanalproteinen identifizieren lassen. Als schwierig stellte sich dabei die Isolierung einer das Kanalprotein bindenden Peptidsequenz mittels Phage-Display heraus. Schwerpunktmäßig wurde in dieser Arbeit an Bindungsassays zwischen den Kanalproteinen und Radioliganden gearbeitet.

## 1. Chimären der niederkonduktiven kalziumabhängigen Kaliumkanäle $SK_{Ca}$

Die Identifizierung und Charakterisierung von Bindungsstrukturen zwischen niederkonduktiven kalziumaktivierten Kaliumkanälen $SK_{Ca}$ und dem kanalblockierenden Bienentoxin Apamin wurden in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Obwohl man wohl davon ausgehen kann, dass alle $SK_{Ca}$-Kanäle ($SK_{Ca}$ 1-3) Apamin, wenn auch mit unterschiedlichen Affinitäten, binden, sind die Mechanismen noch weitgehend ungeklärt [42,16].
In dieser Arbeit wurde, wie es auch mit den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen Kv geschehen ist [57], der prokaryotische Kaliumkanal KcsA als Hilfsmittel zur Analyse

von Bindungsstrukturen benutzt. Abermals wurde die Porenrand- und Kanzelregion (turret) bildende Subregion I der Kaliumkanäle benutzt, in der eine Proteininteraktion zwischen Ligand und Rezeptor wahrscheinlich ist, um Chimären des kalziumaktivierten $SK_{Ca}2$-Kanals herzustellen. Diese können in späteren Bindungsassays benutzt werden. Es wurden verschieden lange Fragmente der Subregion I von $SK_{Ca}2$ mit der vom KcsA ausgetauscht, um u.U. das Fragment oder die Aminosäuren zu identifizieren, die bei Modifikation eine Änderung des Bindungsverhaltens zur Folge haben.

## 1.2 Klonierungsprodukte von rSK2 als KcsA-Ska und KcsA-Skb

Die Chimären KcsA-Ska und KcsA-Skb wurden erfolgreich kloniert. Die Abb. 2 zeigt ein exponentielles Wachstum der mit KcsA-Ska- und KcsA-Skb-DNA transformierten Bakterien nach Induktion mit einem maximalen Bakterienwachstum bei einer $OD_{600}$ von 2,674 für KcsA-Ska und 2,964 für KcsA-Skb. Das Bakterienwachstum schien sogar stärker zu sein, als es bei der Expression von Wildtyp-KcsA mit einem maximalen Bakterienwachstum bei einer $OD_{600}$ von 0,94 und von Chimäre IV mit einer $OD_{600}$ von 1,62 bzw. 2,05 (Abb. 5) der Fall war.

Die Expression von KcsA-Ska- bzw. KcsA-Skb-Protein konnte in einem SDS Polyacrylamid-Gel des elektrophoretisch aufgetrennten Gesamtlysats der Bakterien in Abb. 4 bestätigt werden. Nach der Induktion der Expression mit IPTG zeigte sich eine mit der Zeit deutlicher werdende Bande bei ca. 19 kDa. Die relativ schwache Ausprägung der Bande deutete allerdings auf eine geringe Expressionsrate der Kanalproteine hin.

Die Kanalexpression schien in umgekehrter Proportion zum Bakterienwachstum zu stehen, denn für KcsA und die Chimäre IV konnten wesentlich höhere Proteinausbeuten erzielt werden (Abb. 7), als für die KcsA-SK-Chimären. Während der Expression zeichnete sich für KcsA und die Chimäre IV eine mit der Zeit deutlicher werdende Bande bei 19 kDa nach der Induktion ab (Abb. 6a+b), als es bei der Expression von KcsA-Ska und –Skb der Fall war (Abb. 4).

Es ist bereits länger bekannt, dass Mutationen bzw. Substitutionen in der P-Region des KcsA-Kanals die Stabilität der tetrameren Struktur oder die Expression des

Kanalproteins beeinflussen können [36]. Auf dem Weg der Klonierung und Expression der S5/S6-Region des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.3 im prokaryotischen KcsA-Kanal entstanden anfänglich Chimären mit keiner oder einer sehr geringen Expressivität. Nach Anpassung einer einzelnen Aminosäure an Position 66 in der Subregion I an den KcsA-Kanal erhöhte sich die Expressionsrate [57].

Dies konnte ein Grund für die geringe Expressionsrate von KcsA-Ska und KcsA-Skb gewesen sein, da sich hier an Position 66 ein Methionin anstatt eines Leucins, wie im KcsA-Kanal, befand. Für die anfängliche Entwicklung von Chimären des $SK_{Ca}2$-Kanals galt es jedoch, die ursprüngliche Struktur der Subregion I weitgehend zu erhalten und schrittweise der Struktur des KcsA-Kanals anzupassen, bis sich eine wesentliche Änderung im Bindungsverhalten von Toxinen bemerkbar machte.

Während KcsA-Ska noch die vollständige Subregion I des $rSK_{Ca}2$-Kanals enthielt, wurden in KcsA-Skb schon ein Tyrosin an Position 53 eliminiert und eine Substitution H54D in Angleichung an den nativen KcsA eingeführt.

In Analogie zu den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen Kv1.x sollten im Weiteren auch Chimären mit entsprechenden Substitutionen an Position 82 und 84, KcsA-Skb-Y82V und KcsA-Skb-V84N, sowie eine Doppelmutation KcsA-Skb-Y82V/V84N, hergestellt und untersucht werden (siehe VI.2). An der Position 82 konnte bereits für Kv1.3 mit Substitution an analoger Position H404Y im nativen Kanal eine Bindungsveränderung mit Skorpiontoxinen festgestellt werden [2]. Diese galt es für die Bindung von $SK_{Ca}2$ mit entsprechender Substitution an Position 82 und entsprechenden Liganden zu überprüfen.

Nach erfolgreicher Klonierung der Subregion I von $SK_{Ca}2$ in KcsA bzw. unterschiedlich großen Teilregionen stehen die Bindungsversuche mit Apamin oder anderen an $SK_{Ca}2$ bindenden Toxinen noch aus.

## 1.3 Rolle der Mutation an Position F103L

Während der Klonierung der Chimären KcsA-Ska und KcsA-Skb fand eine Punktmutation eines Phenylalanins an Position 103 zu einem Leucin statt. Diese

Position schien für die adäquate Faltung und Tetramerisierung der Kanalproteine sehr wichtig zu sein [75].

Die Expression der mutierten Kanalproteine KcsA-Ska und KcsA-Skb mit der Mutation F103L schien das Bakterienwachstum nach Induktion mit IPTG stark zu bremsen. Abb. 3 zeigt nach Induktion einen starken Abfall der Wachstumsrate mit einer maximalen Bakteriendichte bei einer $OD_{600}$ von 1,205. Gleichzeitig schien das Kanalprotein in eluierter Form als Tetramer instabil zu sein. Abb. 9a+b zeigt den Vergleich zwischen Chimäre IV in KcsA und dem mutierten Kanalprotein KcsA-Ska-F103L in einem SDS-PAGE. Während sich bei der Chimäre IV das tetramere Protein als eine Bande bei ca. 70 kDa darstellte, zeigte KcsA-Ska-F103L sowohl in denaturierter (B) als auch in nativer (U) Form nur Banden bei ca. 19 kDa, welche die Proteinmonomere darstellten. Allerdings bildeten die Kanalproteine KcsA-Ska und -Skb ohne Mutation im eluierten Zustand ebenfalls keine stabilen Tetramere aus. Eine endgültige Aussage über den tetrameren Status der KcsA-Sk-Chimären lässt sich nur in Bindungsassays mit Liganden und membranständigen im Vergleich zu gelösten Kanalproteinen machen.

Als Ausdruck einer sehr geringen Expressionsrate von KcsA-Ska-F103L zeigt das Elutionsprofil in Abb. 7d eine sehr flache Elutionskurve im Vergleich zu anderen Expressionen (Abb. 7a-c). Selbst eine 0,5 l Kultur von KcsA Wildtyp-Kanal wies ein positiveres Elutionsprofil auf (Abb. 7c), als eine 1 l Kultur von KcsA-Ska-F103L. Gleichzeitig war das Bakterienwachstum aber stark eingeschränkt und nahm nach der Induktion sogar ab. Die Expression der Chimäre KcsA-Ska mit der Mutation F103L hatte möglicherweise einen wachstumsverhindernden Effekt, da insuffiziente Kanalproteine in die Bakterienmembran exprimiert wurden.

## 2. Identifikation charakteristischer Bindungsstellen zwischen Kanaltoxinen und Chimären der Kanäle Kv1.x in KcsA.

Die in weiteren Versuchen verwendeten Chimären KcsA-Kv1.1 (Chi XI) und KcsA-Kv1.1-L81M (Chi XI-M), sowie Chi IV, Chi VIII und Chi VIII-G56T wurden in ähnlicher Weise kloniert (Peptidsequenz in Tab. 1) und exprimiert, wie die im vorigen Abschnitt beschriebenen Chimären. Abb. 5 zeigt exemplarisch das Bakterienwachstum von Chimäre IV in verschiedenen Vektoren, sowie vom KcsA-Kanal im Vektor pQE32. Die Expression nach Induktion konnte im SDS-PAGE für die Proteine verifiziert werden (Abb. 6). Abb. 7a-c zeigen die entsprechenden Elutionsprofile. Für die Chimäre IV ließ sich im Vektor pQE32 eine vergleichsweise höhere Expressionsrate zur selben Chimäre im Vektor pQE70 feststellen.

Für die Chimäre IV konnte eine stabile tetramere Struktur in eluierter, membranungebundener Form bestätigt werden (Abb. 9a) [57].

Eine Möglichkeit neue Liganden zu entdecken bot die Ligandenselektion durch Screening von Phagen-Peptidbibliotheken (Phage-Display) [101,49]. Hierzu wurde eine Phagen-Zufallsbibliothek mit einem Heptapeptid auf dem Mantelprotein der Phagen zur Inkubation mit dem Kanalprotein verwendet. Mögliche bindende Phagen wurden dann selektiert (IV.2.8.1). Es konnten zwei Phagen mit bindendem Heptapeptid vom Wildtyp-Kanal KcsA und fünf Phagen von der Chimäre IV eluiert werden (V.3). Über die Bindungseigenschaften der isolierten Heptapeptide ließ sich allerdings nur eine begrenzte Aussage machen. Es konnte keine sich wiederholende Sequenz in den Panning-Runden isoliert werden. Eine Aussage, ob der Phage tatsächlich an die Porenregion des Kanals band, oder ob er überhaupt einen Einfluss auf die Ionendurchlässigkeit hatte, ließ sich ohne weiteres nicht feststellen. Die Heptapeptide hätten erst isoliert und in höheren Konzentrationen hergestellt werden müssen, um sie in Bindungsassays oder in elektrophysiologischen Experimenten verwenden zu können.

Über Probleme bei der Immobilisation eines Proteins an einer magnetischen $Ni^{2+}$NTA-Sonde zur Ligandenselektion aus einer Phagenbibliothek konnte bereits berichtet werden, da auch hier keine konsensuellen Peptidsequenzen isoliert werden konnten. Ebenfalls wurde berichtet, dass durch Phage-Display selektierte Heptapeptide, die von im ELISA immobilisierten Rezeptorproteinen gewonnen wurden, isoliert keine zufriedenstellende Affinität zum Rezeptor zeigten [27].

Sicherlich bietet der Phage-Display eine gute Möglichkeit, neuartige Oligopeptidliganden zu entdecken. Allerdings benötigt der Phage-Display eine lange Vorbereitungsphase mit vielen Vor- und Kontrollversuchen, in denen sichergestellt wird, dass tatsächlich nur Phagen mit Oligopeptiden selektiert werden, die an die Kanal-Porenregion binden. Dieses zu gewährleisten ist recht schwierig und aufwendig. Neben der idealen Rezeptor- und Phagenkonzentration und den optimalen Milieubedingungen für alle beteiligten Komponenten muss auch nach einem Immobilisationsverfahren für den Kanalrezeptor gesucht werden. Ebenso muss das Hintergrundrauschen unspezifisch und nicht bindender Phagen möglichst gering gehalten werden. Selbst nach erfolgreicher Selektion eines bindenden Phagen lässt sich erst nach Isolation und Amplifikation des Oligopeptids in Folgeversuchen eine Aussage über dessen Bindungseigenschaften in der Porenregion des Kanalpeptids machen.
Deshalb wurde in dieser Arbeit zur Identifikation und Charakterisierung von Bindungsstrukturen im Weiteren auf Bindungsexperimente mit bekannten Liganden und den konstruierten Chimären der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle Kv1.X in KcsA zurückgegriffen.

## 2.1 Bindungsstellen zwischen Hongotoxin 1 ($HgTX_1$) bzw. Kaliotoxin (KTX) und KcsA-Kv1 Chimären in der Subregion III der Porenregion

Viele Skorpiontoxine wiesen eine ausgeprägte Sequenzhomologie (Tab. 5) und eine große Strukturähnlichkeit in der Sekundär-, Tertiär-, und Quartärstruktur der Proteinfaltung auf [2]. Für das Skorpiontoxin Agitoxin 2 ($AgTX_2$) konnten schon für die Bindung an den Kv1.3-Kanal [24] bzw. an den homologen Shaker-Kanal aus *Drosophila melanogaster* [84] wichtige Strukturen identifiziert werden. Die Kristallstrukturanalyse von KcsA [19] wurde zu Grunde gelegt, um ein Kopplungsmodell von $AgTX_2$ an Kv1.3 zu erstellen [24].
Es wurde vorgeschlagen, dass ein zentrales Lysin 27 in $AgTX_2$ über Wasserstoffbrückenbindung an alle vier Tyrosin 395 der Signatursequenz aller α-Untereinheiten in Kv1.3 bindet. Dieses Lysin lässt sich in allen Skorpiontoxinen an homologer Position wiederfinden. Als weitere wichtige Bindungsstellen in $AgTX_2$

wurden Arginin 24, welches zu Aspartat 381 in der ersten α-Untereinheit von Kv1.3 eine Ionenbindung ausbilden würde, sowie Aspartat 30 in $AgTX_2$, welches eine Wasserstoffbrückenbindung zum gegenüberliegenden Aspartat 381 in der dritten α-Untereinheit ausbilden würde, vorgeschlagen. Aspartat 381 befindet sich in der Subregion I des P-Loops (Tab. 1). Neben diesen 3 wichtigsten Bindungspartnern zeigen sich noch weitere wichtige interagierende Aminosäuren zwischen $AgTX_2$ und Kv1.3, welche sich in homologen Strukturen in KTX und $HgTX_1$ wiederfinden (Tab. 5):

Für $AgTX_2$ konnte zwischen Phenylalanin 25 und Methionin 398 der jeweils ersten der vier α-Untereinheiten in Kv1.3 eine hydrophobe Wechselwirkung wahrscheinlich gemacht werden. Die Position 398 in Kv1.3 zeigt sich homolog zur Position L81 in der Subregion III von KcsA. Die Rolle dieser Position in der Bindung sollte auch für KTX und $HgTX_1$ überprüft werden, indem die Bindungseigenschaften der Toxine zu KcsA-Kv1.1 mit denen zur selben Chimäre mit einer Substitution L81M verglichen wurden (VI.2.1.1).

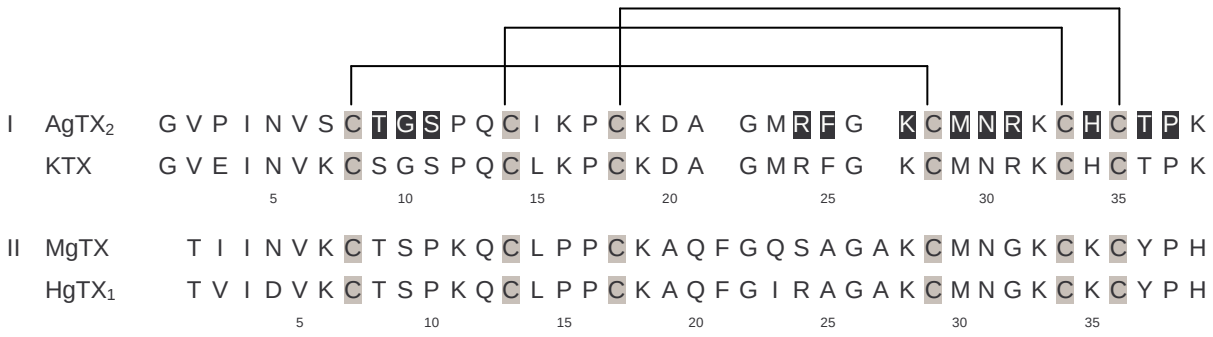
Eine weitere wichtige Position in Kv1.3 in der Subregion III ist das benachbarte Histidin 399. Danach bilden Histidin 399 in der dritten der vier α-Untereinheiten von Kv1.3 hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Methionin 29 und H399 der vierten α-Untereinheit mit dem Threonin 36 in $AgTX_2$ aus. Die homologe Position zu H399 stellt Y82 in KcsA dar. Da KTX ein Methionin und ein Threonin und $HgTX_1$ das Methionin in homologer Position zu $AgTX_2$ besitzen (Tab. 5), sollte die Bindung der Toxine zu den KcsA-Chimären mit entsprechenden Substitutionen an Position 82 überprüft werden. Hierzu wurden die Bindungseigenschaften der Toxine zur KcsA-Chimäre IV mit denen zur Chimäre VIII, die die Doppelmutation L81M/Y82H enthält, verglichen (VI.2.1.2).

Die KcsA-Chimären KcsA-Kv1.1, KcsA-Kv1.2 (in dieser Arbeit nicht weiter aufgeführt) und KcsA-Kv1.3 wurden hergestellt, indem die Subregion I (Tab.1) von KcsA, die die äußere Kanzelregion des Kanalporeneingangs bildet, durch die des entsprechenden Kv-Kanals substituiert wurde. Aus dem Bindungsmodell zwischen KcsA-Kv1.3 und KTX ist bekannt, dass die Aminosäuren der Positionen 56-64 im Kontakt zu KTX stehen [57]. Ebenso sollten die oben beschriebenen Aminosäuren in der Subregion III an Position 81 und 82, die wichtige Bindungsstrukturen in der Bindung mit $AgTX_2$ bilden, in der Bindung mit KTX und $HgTX_2$ überprüft werden. Diese unterscheiden sich im KcsA-Kanal zu Kv1.1, Kv1.2 und Kv1.3 in homologer

Position folgendermaßen: KcsA: LY(82); Kv1.1: MY(379); Kv1.2: MV (381); Kv1.3: MH(399).

Um diese Bindungsstellen für die Ligandenbindung mit KTX und $HgTX_1$ zu überprüfen, wurden neue KcsA-Kv1 Chimären mit entsprechenden Substitutionen an Position 81 und 82 hergestellt: KcsA-Kv1.1-L81M (Chi XI-M); KcsA-Kv1.2-L81M/Y82V (in dieser Arbeit nicht weiter verwendet); KcsA-Kv1.3-L81M/Y82H (Chi VIII). Im Falle der KcsA-Kv1.3-Chimäre war das Kanalprotein nach Einführung der Substitution L81M/Y82H nicht mehr exprimierbar, so dass eine intermediäre Chimäre KcsA-$Kv1.3_{(57-64)}$-L81M/Y82H mit nur partieller Substitution in Subregion I konstruiert wurde [56].

Es wurden dann die Bindungseigenschaften der Chimären mit Substitution in Subregion III für KTX und $HgTX_1$ mit denen der Toxine zu den Chimären ohne die Substitution verglichen.




Kacrorowski [47], Gao [24]

**Tab. 5: Aminosäuresequenzen einiger Peptidinhibitoren der Kv-Kanäle aus Skorpiontoxinen.** Gruppe I: $AgTX_2$: Agitoxin 2 und KTX: Kaliotoxin; Gruppe II: MgTX: Margatoxin und $HgTX_1$: Hongotoxin 1. Grau unterlegt und mit Linien verbunden sind die Cystinbrücken. Schwarz unterlegt: wichtige potentielle Bindungsstellen in $AgTX_2$ für die Bindung an Kv1.3.

| | KcsA-Kv1.1 | | KcsA-Kv1.3 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Chi XI** | **Chi XI-L81M** | **Chi IV** | **Chi VIII** | **Chi VIII-G56T** |
| ***HgTX$_1$*** | **$IC_{50}$: 0,6 nM** | **$IC_{50}$: 28,9 nM** | **$IC_{50}$: 0,23 nM** | **$IC_{50}$: 2,97 nM** | **$IC_{50}$: 0,16 nM** |
| | | | **$K_d$: 29,5 pM*** | **$K_d$: 582 pM *** | **$K_d$: 122 pM *** |
| | | | **$K_{on}$: 1,1 x$10^9$ $M^{-1}min^{-1}$*** | **$K_{on}$: 1,05 x$10^9$ $M^{-1}min^{-1}$** | **$K_{on}$: 3,26 x$10^9$ $M^{-1}min^{-1}$** |
| | | | **$K_{off}$:** **Membranen:** **0,292 $min^{-1}$*** **Liposomen:** **0,136 $min^{-1}$** | **$K_{off}$:** **Membranen:** **0,2581 $min^{-1}$** **Liposomen:** **n. b.** | **$K_{off}$:** **Membranen:** **0,5128 $min^{-1}$** **Liposomen:** **n. b.** |
| ***KTX*** | **$IC_{50}$: 4,5 nM*** | **$IC_{50}$: 20,7 nM*** | **$IC_{50}$: 0,37 nM** **$K_d$: 63,4 pM*** | **$IC_{50}$: 6,08 pM** **$K_d$: 6,1 pM*** | **$IC_{50}$: 5,81 pM** **$K_d$: 5,1 pM*** |

* Daten von C. Legros [56]

**Tab. 6: Verschiedene Bindungskonstanten für die KcsA-Kv1.1- und KcsA-Kv1.3 Chimären.**
n. b.: nicht bestimmt

### 2.1.1 Rolle der Position 81 der Subregion III in der Bindung mit $^{125}$I-HgTX$_1$-A19Y/Y37F und $^{125}$I-KTX

Eine der Position 81 im KcsA-Kanal und den KcsA-Chimären homologe Position ist Methionin 448 im den Kv1-Kanälen verwandten Shaker Kanal aus *Drosophila melanogaster*. Eine Substitution M448A zeigte in Bindungsversuchen mit Agitoxin 2 ($AgTX_2$) einen Abfall der Bindungsaffinität um das 80-fache, mit einer $K_d$ von 0,741 nM im Shaker-Kanal ohne Mutation auf eine $K_d$ von 60,13 nM im Shaker-Kanal mit Mutation. Es zeigte sich, dass das Methionin an Position 448 mit dem Phenylalanin an Position 25 in $AgTX_2$ in hydrophober Wechselwirkung stand [84].

Für $AgTX_2$ als Ligand konnte eine 89%ige Strukturübereinstimmung zu KTX nachgewiesen werden (Tab. 5) [26].

Analog zur Bindung des Shaker-Kanals zu $AgTX_2$ war es wahrscheinlich, dass das Leucin an Position 81 der KcsA-Kv1.1 Chimäre in hydrophober Wechselwirkung zu F25 in KTX stehen würde, welche stärker ausgeprägt war, als mit einem Methionin an dieser Position.

Zwischen der Chimäre XI und der Chimäre XI-M mit der Mutation L81M konnten sowohl für Kaliotoxin als auch für Hongotoxin unterschiedliche Bindungskonstanten ermittelt werden, die sich für KTX um das 5-fache und für $HgTX_1$ um das 50-fache unterschieden (Tab. 6). Für die Chimäre XI konnte eine $IC_{50}$ von 4,5 nM in der Bindung zu KTX festgestellt werden, die somit eine ca. 8-fach niedrigere Affinität aufwies, als in der Bindung zu $HgTX_1$ mit einer $IC_{50}$ von 0,6 nM. Im Falle der Chimäre XI-M mit der Substitution L81M zeigten die Bindungsversuche mit KTX eine $IC_{50}$ von 20,7 nM und mit $HgTX_1$ einen ähnlichen Wert von 28,9 nM. Die Unterschiede in den Affinitäten der Toxine zum Kanal waren somit fast aufgehoben.

Es ließ sich also eine Abschwächung der Affinität zu den Toxinen mit der Substitution L81M in der KcsA-Kv1.1 Chimäre feststellen, die im Fall von $HgTX_1$ sogar noch ausgeprägter war, als bei KTX. Das Leucin an Position 81 scheint somit für beide Toxine eine Rolle für ihre Bindung zum Kanal zu spielen. In Hongotoxin 1 befindet sich ein Alanin an homologer Position zum Phenylalanin 25 in KTX (Tab. 5). Möglicherweise steht dieses ebenso in hydrophober Wechselwirkung zum Leucin an Position 81 in der KcsA-Kv1.1 Chimäre, was die hohe Affinität von $HgTX_1$ zum Kanal erklären könnte.

### 2.1.2 Rolle der Position 82 der Subregion III in der Bindung mit $^{125}$I-HgTX-A19Y/Y37F und $^{125}$I-KTX

Für das Skorpiontoxin Margatoxin (MgTX) konnte eine 89%ige Sequenzübereinstimmung der Aminosäuren zu Hongotoxin 1 ($HgTX_1$) festgestellt werden (Tab. 5) [47]. In Bindungsstudien mit MgTX am nativen Kv1.3-Kanal konnte gezeigt werden, dass die Substitution H404Y keinerlei Einfluss auf das

Bindungsverhalten hat [2]. Die Position 404 (entspricht oben H399) im nativen Kv1.3 Kanal entspricht strukturell der Position 82 im KcsA-Kanal. Um herauszufinden, ob diese Position 82 für die Bindung von $HgTX_1$ an Kv1.3 wichtig ist, wurde untersucht, ob die Substitution L81M/Y82H in der Chimäre VIII Einfluss auf die Bindung mit $HgTX_1$ hatte. Wegen der Exprimierbarkeit wurde eine KcsA-$Kv1.3_{(57-64)}$ Chimäre VIII mit Substitution L81M/Y82H verwendet (VI.2.1).

Die kompetitiven Bindungsexperimente konnten zeigen, dass die Chimäre VIII mit Doppelsubstitution L81M/Y82H eine ca. 13-fach geringere Affinität zu $^{125}$I-$HgTX_1$-A19Y/Y37F mit einer $IC_{50}$ von 2,97 nM (Abb. 13) gegenüber der Chimäre IV mit einer $IC_{50}$ von 0,23 nM (Abb. 12) aufweist. Dieser negative Effekt der Doppelmutation auf die Affinität konnte in Bindungssättigungsexperimenten, in denen Chimäre IV eine $K_d$ von 29,5 pM und Chimäre VIII eine $K_d$ von 582 pM aufwies, bestätigt werden (Tab. 6).

In den kinetischen Experimenten wurde für Chimäre IV eine Assoziationsratenkonstante ($k_{on}$) von 1,1 x$10^9$ $M^{-1}min^{-1}$ gegenüber einer $k_{on}$ von 1,05 x$10^9$ $M^{-1}min^{-1}$ für die Chimäre VIII festgestellt. Die Dissoziationsratenkonstante zeigte für Chimäre IV eine $k_{off}$ von 0,292 $min^{-1}$ und für Chimäre VIII eine $k_{off}$ von 0,258 $min^{-1}$. Die Ergebnisse zeigten einen geringen Unterschied der Konstanten an den beiden Chimären IV und VIII, was mit den Ergebnissen aus den Bindungsexperimenten mit der Kv1.3-H404Y Mutation und MgTX übereinstimmte. Die Doppelmutation L81M/Y82H in der KcsA-Kv1.3 Chimäre hatte also einen negativen Einfluss in der Bindung mit $HgTX_1$.

Anders zeigte sich das Bindungsverhalten der Chimären IV und VIII mit KTX. KTX wies zur Chimäre VIII mit einer $IC_{50}$ von 6 pM eine ca. 60-fach höhere Affinität auf, als zur Chimäre IV mit einer $IC_{50}$ von 370 pM (Tab. 6). Ein affinitätssteigernder Effekt in der Bindung mit KTX konnte für die Substitution des Tyrosins an Position 82 durch andere Aminosäuren in den KcsA-Chimären bereits ausgemacht werden. Das Tyrosin an Position 82 scheint ein sterisches Hindernis in der Kanalkonfiguration zu bilden, das die Bindung von KTX an die Kanalpore erschwert [57].

Offensichtlich scheint das Histidin an Position 82 in der KcsA-Kv1.3 Chimäre die Bindungsaffinität mit KTX also zu steigern, während es die Affinität zu $HgTX_1$ unbeeinflusst lässt. Dieses könnte auf eine Interaktion zwischen dem H82 in Chimäre VIII und dem T36 in KTX hinweisen, wie sie schon zwischen AgTX2 und Kv1.3 in homologer Position beschrieben wurde [24].

Für die Position D370 in Subregion I in Kv1.3 wurde über eine pH-abhängige Bindung zu H34 in KTX berichtet [103]. In der Chimäre VIII wurde diese Region aufgrund der Exprimierbarkeit aus Kv1.3 nicht übernommen. Dennoch scheint die Doppelmutation L81M/Y82H den Verlust dieser Bindungsstelle zu kompensieren. Auch wuden in dieser Arbeit die Bindungsexperimente im physiologischen pH-Bereich von 7,4 durchgeführt, so dass die fehlende Bindungsstelle in Subregion I in der Bindung mit KTX möglicherweise nicht ins Gewicht fällt.
Für $HgTX_1$ konnte eine vergleichbare Bindungsstelle in homologer Position bisher nicht beschrieben werden. In Bindungsexperimenten mit einer KcsA-Kv1.2-L81M/Y82V Chimäre konnte eine Affinitätssteigerung zu $HgTX_1$ nach Einführung der Doppelmutation L81M/Y82V beobachtet werden (Daten hier nicht aufgeführt) [56]. Im Fall der Chimäre VIII mit der Doppelsubstitution L81M/Y82H zeigte sich eine Minderung der Affinität zu $HgTX_1$ im Vergleich zur Chimäre IV. Deshalb war in Betracht zu ziehen, dass die sich von der Chimäre IV unterscheidenden Aminosäuren in der Subregion I der Chimäre VIII für die Minderung der Affinität verantwortlich sind.

Im Vergleich der beiden Toxine KTX und $HgTX_1$ in den Bindungskonstanten zu den Chimären untereinander (Tab. 6) zeigte sich für die Chimäre IV eine nur ca. 1,5-fach höhere Affinität zu $HgTX_1$ mit einer $IC_{50}$ von 0,23 nM gegenüber KTX mit einer $IC_{50}$ von 0,37 nM. Mit der Substitution L81M/Y82H in Chimäre VIII fiel die Affinität zu $HgTX_1$ stark ab ($IC_{50}$= 2,97 nM), während sie für KTX stark anstieg ($IC_{50}$= 6,08 pM). Die beiden $IC_{50}$ aus der Bindung mit der Chimäre VIII unterschieden sich um den Faktor 490. Die Doppelmutation in der Subregion III scheint eine wichtige Rolle in der Bindung mit KTX zu spielen, während sie auf die Bindung mit $HgTX_1$ einen negativen Einfluss hat (VI.2.1).

## 2.2 Bindungsstellen zwischen Hongotoxin 1 ($HgTX_1$) bzw. Kaliotoxin (KTX) und KcsA-Chimären in der Subregion I

Zur näheren Charakterisierung des Bindungsverhaltens zwischen $^{125}$I-$HgTX_1$(A19Y/Y37F) und KcsA-Kv1.3 wurden die sich vom KcsA-Kanal

unterscheidenden Aminosäuren in Subregion I herangezogen. Aus dem Strukturmodell für die Wechselwirkung zwischen Kv1.3 und $AgTX_2$ war bereits bekannt, dass in Kv1.3 das Threonin 373 der zweiten der vier α-Untereinheiten potentiell eine Wasserstoffbrückenbindung mit Threonin 9 in $AgTX_2$ und das T373 der vierten α-Untereinheit eine hydrophobe Wechselwirkung mit dem Prolin 37 in $AgTX_2$ eingehen [24]. Da sich P37 und T9 in $HgTX_1$ an homologen Positionen befinden (Tab. 5), sollte die Bindung zur homologen Position von T373 in der Subregion I von KcsA, welche G56 entspricht (Tab. 1), mit KTX und $HgTX_1$ untersucht werden. Es wurde eine intermediäre Chimäre von Chimäre VIII mit einer Substitution G56T benutzt, die ebenfalls die Doppelsubstitution L81M/Y82H enthält.

In Bindungsexperimenten konnte für die Chimäre VIII-G56T mit einer $IC_{50}$ von 0,16 nM (Abb. 13) eine 18,6-fach höhere Affinität des Liganden $^{125}$I-$HgTX_1$(A19Y/Y37F) zum Kanal festgestellt werden als für die Chimäre VIII ohne diese Mutation mit einer $IC_{50}$ von 2,97 nM (Tab. 6). Die Bindungskonstanten bestätigen die Tendenz der Affinitäten aus Bindungssättigungsexperimenten mit $^{125}$I-$HgTX_1$-A19Y/Y37F. Hier konnte für die Chimäre VIII eine $K_d$ von 582 pM festgestellt werden. Im Vergleich wurde für die Chimäre VIII-G56T eine $K_d$ von 122 pM und somit eine ca. 5-fach höhere Affinität festgestellt (Tab. 6).

Ebenso zeigten die Chimäre IV mit einem Threonin an Position 56 und ohne die Doppelsubstitution L81M/Y82H im Vergleich zur Chimäre VIII-G56T mit der Doppelmutation einen nur sehr geringen Unterschied zwischen den Affinitäten zu $HgTX_1$. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Threonin an Position 56 in KcsA-Kv1.3 die Affinität zu $HgTX_1$ beeinflusst [56].

Kinetische Experimente konnten zeigen, dass die Chimäre VIII-G56T ein ca. 3-fach größere Assoziationsratenkonstante besitzt ($k_{on}$= 3,26 x$10^9$ $M^{-1}min^{-1}$), als die Chimäre VIII ohne die Mutation mit einer $k_{on}$ von 1,05 x$10^9$ $M^{-1}min^{-1}$ (Abb. 16).

Bei Ermittlung der Dissoziationsratenkonstante zeigte die Chimäre VIII mit der Substitution G56T eine 2-fach schnellere Dissoziation mit einer $k_{off}$ von 0,5277 $min^{-1}$, als die Chimäre ohne Mutation mit einer $K_{off}$ von 0,2581 $min^{-1}$ (Abb. 15).

Aus dem Verhältnis $k_{off}/k_{on}$ der beiden Konstanten lässt sich die Dissoziationskonstante $K_d$ berechnen. Diese war mit 245 pM für die Chimäre VIII ohne Substitution und mit 157,3 pM für die Chimäre VIII-G56T näherungsweise übereinstimmend mit

Dissoziationskonstanten $K_d$, die in Bindungssättigungsexperimenten ermittelt wurden (Tab. 6).

Der signifikante Unterschied zwischen den Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten liefert einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung des Threonins an Position 56 in der Bindung zwischen $^{125}$I-$HgTX_1$-(A19Y/Y37F) und KcsA-Kv1.3, welche für die Bindung mit KTX keine Rolle zu spielen scheint [56]. $^{125}$I-KTX zeigte eine ähnliche Affinität zu beiden Chimären VIII mit und ohne Mutation G56T mit einer IC50 von 6,08 pM bzw. 5,81 pM (Tab. 6). Die Ergebnisse bestätigten die Gleichgewichtsdissoziationsraten ($K_{off}$) aus Bindungssättigungsexperimenten mit $^{125}$I-KTX. Hier zeigte sich für Chimäre VIII ohne Substitution eine $K_d$ von 6,1 pM und für Chimäre VIII-G56T eine $K_d$ von 5,1 pM (Tab. 6) [56].

Obwohl sich das oben beschriebene Prolin 37 in $AgTX_2$ und $HgTX_1$ auch in KTX wiederfindet und obwohl sich an homologer Position 9 das sehr ähnliche Serin anstelle des Threonin in KTX befindet (Tab. 5), zeigten $HgTX_1$ und KTX bei der Substitution G56T in der Chimäre VIII ein recht unterschiedliches Bindungsverhalten. Für KTX scheint also die Position 56 in Subregion I der KcsA-Chimären im Bindungsverhalten unwichtig zu sein, was darauf schließen lässt, dass beide Toxine trotz großer Strukturähnlichkeit [47] aller Wahrscheinlichkeit nach auf geringfügig unterschiedliche Weise an den Kanal binden. Möglicherweise sind kleine Strukturunterschiede oder unterschiedliche Bindungsstrukturen außerhalb der Subregion I der verschiedenen Kanalproteine für die Bindung der beiden Toxine verantwortlich [58].

Im Vergleich der beiden Toxine KTX und $HgTX_1$ in den Bindungskonstanten zu den Chimären untereinander zeigte sich Folgendes: In den Bindungsexperimenten mit der Chimäre VIII mit der Substitution G56T in Subregion I zeigte sich für $HgTX_1$ eine $IC_{50}$ von 0,16 nM, die eine ca. 28-fach niedrigere Affinität aufwies, als die für KTX mit einem Wert von 5,81 pM. Die Substitution G56T in Subregion I scheint den Affinitätsverlust der Chimäre VIII mit der Doppelmutation L81M/Y82H in Subregion III in der Bindung mit $HgTX_1$ teilweise zu kompensieren. Für die Bindung von KTX hat die Substitution G56T allerdings keinen Einfluss.

## 2.3 Veränderung des Bindungsverhaltens von Chimäre IV in Liposomen

Die Dissoziationsratenkonstanten $k_{off}$ stellten sich für alle drei Chimären IV, VIII und VIII-G56T recht unterschiedlich dar. Im Vergleich zur Chimäre IV (Abb. 17) zeigte sich hier für die Chimäre VIII-G56T (Abb. 15) eine sogar 4-fach größere Dissoziationsratenkonstante. Daraus konnte man schließen, dass die Kanalproteine in ihren verschiedenen Verankerungs- oder Lösungszuständen recht unterschiedliche Bindungseigenschaften aufweisen. Die Verankerung oder Expression des Kanals in Bakterienmembranen hätte eine geringfügig andere Konformation aufweisen konnen, als der nach Expression nachträglich in eine Lipid-Doppelmembran eingebrachte Kanal im Fall der Liposomen, so dass sich die Bindungsaffinitäten veränderten. Für das Bindungsverhalten nativer Kv1.3-Kanäle in eukaryotischen Biomembranen gegenüber ihren Chimären in KcsA konnte ein deutlicher Unterschied im Bindungsverhalten ausgemacht werden [58], so dass, abgesehen von Bindungsstrukturen außerhalb der Subregion I der Porenregion, auch eine unterschiedliche Zugänglichkeit des Toxins an den Kanal in verschiedenen Biomembranen postuliert werden konnte.
Eines der Probleme bei der Interpretation von Affinitäten aller Chimären könnte die unterschiedliche Sekundär- und Tertiärstruktur der KcsA-Chimären gegenüber der von nativen humanen Kv-Kanäle sein. Die KcsA-Chimären hätten sich andersartig falten können, so dass sich Aminosäurereste bei analoger Primärstruktur in der Porenregion anders präsentieren würden, als in den nativen Kanälen.

## 2.4 Auswertung von Bindungsexperimenten

Eine Möglichkeit, die Affinität eines Liganden zu einem Rezeptor zu untersuchen, besteht in Bindungssättigungsexperimenten, bei denen der Rezeptor mit verschiedenen Konzentrationen radioaktiv markierter Liganden inkubiert wird. Eine andere Möglichkeit besteht darin, wie in den kompetitiven Bindungsexperimenten in dieser Arbeit dargestellt, die Konzentration des Radioliganden konstant zu halten und ihn mit unmarkierten Liganden um den Rezeptor konkurrieren zu lassen. Der große Vorteil in

der zweiten Methode besteht darin, dass weniger teurer und aufwendig herzustellender Radioligand verbraucht wird.

In homologen Bindungsexperimenten gilt: $IC_{50}$= [Radioligand]+ $K_d$. Aus der Gleichung lässt sich ersehen, dass bei hohen Konzentrationen an Radioliganden, die über das zehnfache der $K_d$ liegen, sich die $IC_{50}$ nur unwesentlich ändert. Auf der anderen Seite führen zu geringe Konzentrationen an Radioliganden im Verhältnis zum Rezeptor zur Erschöpfung des freien Liganden. Das bedeutet, dass mit steigenden Konzentrationen an nicht markiertem Liganden, wie im Experiment vorgesehen, auch die Konzentration an freiem Radioliganden ansteigt, da dieser vom Rezeptor verdrängt wird. Voraussetzung von homologen Bindungsexperimenten ist allerdings eine konstant gleiche Rezeptor- und Radioligandenkonzentration in allen Verdünnungsreihen des unmarkierten Kompetitors [70].

Dennoch wurde die Konzentration des Radioliganden in den vorliegenden Experimenten weit unter der ermittelten $IC_{50}$ gewählt, um den Verbrauch des aufwendig und teuer zu erhaltenden Radioliganden möglichst gering zu halten.

Daten mit einer möglichen Ligandenerschöpfung lassen sich durch eine Gleichung mathematisch transformieren, indem indirekt für jeden Wert die wirkliche Konzentration an Radioliganden und unmarkiertem Kompetitor im Reaktionsgleichgewicht ermittelt wird [97]. Für die transformierten Daten ließen sich sehr ähnliche Werte im Vergleich zu den untransformierten feststellen, so dass Ligandenerschöpfung in den vorliegenden Experimenten eine geringere Rolle gespielt zu haben schien.

Ein ähnliches Problem ergibt sich bei der Ermittlung der Assoziationsratenkonstante $k_{on}$ aus der observierten Assoziationsratenkonstante $k_{ob}$ nach der Beziehung $k_{on}$= ($k_{ob}$ $k_{off}$)/ [Radioligand]. Bei sehr geringen Konzentrationen an Radioliganden ergeben schon geringe Unterschiede in $k_{ob}$ im Rahmen des Experimentierfehlers recht große Schwankungen in der $k_{on}$, so dass der wahre Wert schwierig zu ermitteln ist.

Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass sich zur genauen quantitativen Charakterisierung der Dissoziationskonstante $K_d$ Bindungssättigungsexperimente und das Verhältnis aus Assoziation- und Dissoziationsratenkonstante $k_{on}/k_{off}$ besser eignen, als kompetitive Bindungsexperimente. Sie lassen sich besser nutzen, wenn man zuvor eine Größenvorstellung der Dissoziationskonstante gewonnen hat. Allerdings ließ sich ein qualitativer Unterschied, ob also überhaupt ein Unterschied in der Bindungsaffinität

zwischen zwei Chimären gegenüber den Toxinen besteht, auch anhand der vorliegenden kompetitiven Bindungsexperimente feststellen.

## 3. Aussichten der Strukturaufklärung und Charakterisierung von Kaliumkanälen und Liganden.

Diese Arbeit konnte einen Beitrag zur Strukturaufklärung von KcsA-Kv1.X Chimären liefern. Hierbei stellte sich der prokaryotische KcsA-Kanal als ein vorteilhaftes Hilfsmittel heraus, um in seiner Porenregion die humanen Kv- und SK-Kanäle als Chimären zu imitieren.

Durch die Strukturaufklärung von Kanalrezeptoren und ihren Liganden lassen sich sehr spezifische, neue, den Kanal beeinflussende Substanzen herstellen. Der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Kv1.3 stellt ein wirkungsvolles Ziel in der Entwicklung von immunmodifizierenden Substanzen zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen oder der Vorbeugung der Organabstoßungsreaktion nach Transplantation dar [15].

Anhand der Strukturaufklärung des Kaliumkanals Kv1.3 konnten synthetische Kanalinhibitoren entwickelt werden, die die T-Zellaktivierung messbar unterdrücken [33,22,60]. Teilweise konnte schon durch die Veränderung einer einzelnen Aminosäure am Peptidliganden die Selektivität für einen Kanal stark erhöht werden [48]. Durch die Entwicklung von T-lymphozytären Kanalliganden, die nur einen Kanaltyp inhibieren, lassen sich hochspezifische Immunsuppressiva entwickeln. Allerdings kommt kein Kaliumkanal ausschließlich auf T-Lymphozyten vor. Durch die Charakterisierung vieler Kaliumkanäle auf T-Lymphozyten ließe sich eine Art Cocktail von Kanalinhibitoren kreieren, die in ihrer Gesamtheit spezifisch für T-Lymphozyten und für andere Organsysteme nebenwirkungsärmer wären.

Für die Substanzgruppe der Psoralene, die bisher bevorzugt in der Therapie der Psoriasis eingesetzt werden, konnte eine Beeinflussung der Signaltransduktion in T-Lyphozyten über die Inhibition der Kv1.x-Kanäle berichtet werden [96]. Für die Substanzgruppe wurde eine suppressive Wirkung von Autoimmunprozessen im ZNS z.B. bei der Entstehung der Multiplen Sklerose und anderen Autoimmunerkrankungen

postuliert. Diese Eigenschaft könnte dann auch anderen Kanalinhibitoren der Kv1.X-Kanäle zugeschrieben werden.

Ebenfalls wurde über so genannte Fetaltyp-T-Lymphozyten berichtet, deren Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose oder Myasthenia gravis noch recht kontrovers diskutiert wird [68]. Es wäre vorstellbar, dass solche T-Lymphozyten-Subtypen und Vorstufen mit anderen Expressionsmustern von Kaliumkanal-Typen im Vergleich zu gesunden adulten T-Lymphozyten sehr spezifisch über diese Kanäle supprimiert werden könnten.

Die Strukturaufklärung der Kaliumkanäle auf T-Lymphozyten kann also auch einen direkten Angriffspunkt in der Therapie von Autoimmunerkrankungen liefern.

# VII Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde nach charakteristischen Bindungsstrukturen zwischen verschiedenen Kaliumkanälen auf T-Lymphozyten und entsprechenden Liganden gesucht. Teile der Porenregion der eukaryotischen spannungsgesteuerten Kaliumkanäle Kv1.1 und Kv1.3 konnten mit der Porenregion des prokaryotischen KcsA-Kanals ausgetauscht werden, so dass KcsA die Porenregion der humanen Kaliumkanäle imitiert. In dieser Arbeit wurde der Austausch der Porenregion am Beispiel des auf leukämischen Jurkat T-Lymphozyten exprimierten kalziumaktivierten Kaliumkanals $SK_{Ca}2$ erfolgreich vorgenommen. Die Kanalchimären KcsA-Ska und KcsA-Skb konnten in einer E.coli M15-Kultur exprimiert werden.

Des Weiteren wurde in Bindungsassays das Bindungsverhalten zwischen den Kanalchimären KcsA-Kv1.1 sowie KcsA-Kv1.3 und den Kanaltoxinen Hongotoxin 1 ($HgTX_1$) und Kaliotoxin (KTX) untersucht. Im Fall von KcsA-Kv1.1 (Chi XI) wurde eine Substitution L81M in der Subregion III der Kanalpore eingeführt und mit der Bindungscharakteristik ohne Substitution verglichen. Es konnte für $HgTX_1$ ein sogar noch größerer Abfall der Affinität festgestellt werden als für KTX. Das Leucin an Position 81 scheint also für die Bindung beider Toxine wichtig zu sein.

Die KcsA-Kv1.3 Chimäre (Chi IV) wurde mit der einer Doppelmutation L81M/Y82H (Chi VIII) in Subregion III in Bindungsassays verglichen. In die Chimäre VIII wurde zusätzlich eine Substitution G56T in Subregion I eingefügt und in Bindungsassays untersucht. Für das Threonin an Position 56 konnte so ein entscheidender Beitrag in der Bindung zu $HgTX_1$ festgestellt werden, während diese Position für die Bindung mit KTX keine Rolle zu spielen scheint. Die Doppelmutation in der Subregion III (Chi VIII) scheint im Fall von Kv1.3 und der Bindung mit den benutzten Kanaltoxinen eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die Identifikation neuer Bindungsstrukturen in Kaliumkanälen auf T-Lymphozyten sowie die Entwicklung neuer Liganden, die die Ionendurchlässigkeit der Kanäle beeinflussen, kann der Entwicklung hochspezifischer Immunsuppressiva und Autoimmuntherapeutika dienen. Hierbei stellten sich die KcsA-Chimären als hervorragende Mini-Modelle der eukaryotischen Kanalporen für pharmakologische Bindungsstudien heraus.

# VIII Literaturverzeichnis

[1] Aiyar J (1999) Potassium channels in leucocytes and toxins that block them: Structure, functions and therapeutic implications. Perspectives in Drug Discovery and Design 15/16:257-280

[2] Aiyar J, Withka JM, Rizzi JP, Singleton DH, Andrews GC, Lin W, Boyd J, Hanson DC, Simon M, Dethlefs B, 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

[3] Armstrong CM (1997) A closer picture of the K channel gate from ion trapping experiments. J Gen Physiol 109(5):523-4

[4] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Sedman JG, Smith JA, Struhl K.eds (1995) Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley and Sons

[5] Birnboim HC, Doly JA (1979) A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. Nucleic Acid Res 7:1513-23

[6] Cahalan MD, Chandy KG (1997) Ion channles in the immune system as targets for immunosuppression. Curr Opin Biotechnol 8:749-56

[7] Cahalan MD, Chandy KG, DeCoursey TE, Gupta S (1985) A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. J Physiol 358:197-237

[8] Cahalan MD, Chandy KG, DeCoursey TE, Gupta S, Lewis RS, Sutro JB (1987) Ion channels in T lymphocytes. Adv Exp Med Biol 213:85-101

[9] Cahalan MD, Wulff H, Chandy KG (2001) Molecular Properties and Physiological Roles of Ion Channels in the Immune System. J Clin Immunol. 21(4): 235-52. Review.

[10] Catterall WA (1995) Structure and function of voltage-gated ion channels. Annu Rev Biochem 64:493-531

[11] Chandy KG, Gutman GA (1993) Nomenclature of mammalian potassium channel genes. Trends Pharmacol Sci 14(12):434

[12] Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W (1992) Prevention of pre-PCR mis-priming and primer-dimerization improves low-copy-number amplifications Nucleic Acids Res 20(7):1717-23

[13] Cortes DM, Perozo E (1997) Structural dynamics of the Streptomyces lividans K+ channel (SKC1): oligomeric stoichiometry and stability. Biochemistry 36(33):10343-52

[14] Covarrubias M, Wie AA, Salkoff L (1991) Shaker, Shal, Shab, Shaw express independent K+ current systems. Neuron 7(5):763-73

[15] Curran ME (1998) Potassium ion channels and human disease: phenotypes to drug targets? Curr Opin Biotechnol 9:565-72

[16] Dale TJ, Cryan JE, Chen MX, Trezise DJ (2002) Partial apamin sensitivity of human small conductance Ca2+-activated K+ channels stably expressed in Chinese hamster ovary cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 366(5):470-7

[17] DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD (1987) Two types of potassium channels in murine T lymphocytes. J Gen Physiol 89(3):379-404

[18] Desai R, Peretz A, Idelson H, Lazarovici P, Attali B (2000) $Ca^{2+}$-activated $K^+$ Channels in Human Leukemic Jurkat T Cells. J Biol Chem 275(51):39954-63

[19] Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of $K^+$ conduction and selectivity. Science 280(5360):69-77

[20] Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J, Beckingham K, Chandy KG, Cahalan MD, Aiyar J (1999) Calmodulin Mediates Calcium-dependent Activation of the Intermediate Conductance $K_{Ca}$ Channel, IKCa1. J Biol Chem 274(9):5746-54

[21] Fanger CM, Rauer H, Neben AL, Miller MJ, Rauer H, Wulff H, Campos-Rosa J, Ganellin R, Chandy KG, Cahalan MD (2001) Calcium-activated Potassium Channels Sustain Calcium Signaling in T Lymphocytes. J Biol Chem 276(15):12249-56

[22] Felix JP, Bugianesi RM, Schmalhöfer WA, Borris R, Goetz MA, Hensens OD, Bao J-M, Kayser F, Parsons WH, Rupprecht K, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Slaughter RS (1999) Identification and Biochemical Characterization of a Novel

Nortriterpene Inhibitor of the Human Lymphocyte Voltage-Gated Potasium Channel, Kv1.3. Biochemistry 38: 4922-30

[23] Freedman BD, Fleischmann BK, Punt JA, Gaulton G, Hashimoto Y, Kotlikoff MI (1995) Identification of Kv1.1 Expression by Murine $CD4^-CD8^-$ Thymocytes. J Biol Chem 270(38):22406-11

[24] Gao Y-D, Garcia ML (2003) Interaction of agitoxin2, charybdotoxin, and iberiotoxin with potassium channels: Selectivity between voltage-gated and Maxi-K channels. Proteins 52(2):146-54

[25] Garcia ML, Galvez A, Garcia-Calvo M, King VF, Vazquez J, Kaczorowski GJ (1991) Use of toxins to study potassium channels. J Bioenerg Biomembr 23(4):615-46

[26] Garcia ML, Garcia-Calvo M, Hidalgo P, Lee A, MacKinnon R (1994) Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K+ channels from Leiurus quinquestriatus var. Hebraeus venom. Biochemistry 33(22):6834-9

[27] Gaskin DJ, Starck K, Turner NA, Vulfson EN (2001) Phage display combinatorial libraries of short peptides: ligand selection for protein purification. Enzyme Microb Technol 28(9-10):766-72

[28] Gazarian T, Selisko B, Herion P, Gazarian K (2000) Isolation and structure-functional characterization of phage display library-derived mimotopes of noxiustoxin, a neurotoxin of the scorpion Centruroides noxius Hoffmann. Mol Immunol 37(12-13):755-66

[29] Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG (2000) Up-regulation oh the IKCa1 Potasium Channel during T-cell Activation. J Biol Chem 275(47):37137-49

[30] Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, Chandy KG (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

[31] Grunnet M, Jensen BS, Olesen SP, Klaerke DA (2001) Apamin interacts with all subtypes of cloned small-conductance $Ca^{2+}$-activated $K^+$ channels. Pflügers Arch – Eur J Physiol 441:544-50

[32] Hackos DH, Chang T-H, Swartz KJ (2002) Scanning the Intracellular S6 Activation Gate in the Shaker $K^+$ Channel. J Gen Physiol 119(6):521-31

[33] Hanson DC, Nguyen A, Mather RJ, Rauer H, Koch K, Burgess LE, Rizzi JP, Donovan CB, Bruns MJ, Canniff PC, Cunningham AC, Verdries KA, Mena E, Kath JC, Gutman GA, Cahalan MD, Grissmer S, Chandy KG (1999) UK-78,282, a novel piperidine compound that potently blocks the Kv1.3 voltage-gated potassium channel and inhibits human T cell activation. British Journal of Pharmacology 126:1707-16

[34] Harvey AL, Dufton MJ (1999) The therapeutic potential for targetting potassium channels: Are dendrotoxins a suitable basis for drug design? Perspectives in Drug Discovery and Design 15/16:281-94

[35] Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R (1994) Mutations in the K+ channel signature sequence. Biophys J 66(4):1061-7

[36] Heginbotham L, Odessey E, Miller C (1997) Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K+ channel. Biochemistry 36(33):10335-42

[37] Helms LMH, Felix JP, Bugianesi RM, Garcia ML, Stevens S, Leonard RJ, Knaus H-G, Koch R, Wanner SG, Kaczorowski GJ, Slaughter RS (1997) Margatoxin Binds to a Homomultimer of Kv1.3 Channels in Jurkat Cells. Comparison with Kv1.3 Expressed in CHO Cells. Biochemistry 36:3737-44

[38] Hille B(1992) G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. Neuron 9(2):187-95

[39] Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene 77(1):51-9

[40] Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High Efficiency Transformation of Escherichia Coli with Plasmids. Gene 96:23-28

[41] Isacoff EY, Jan YN, Jan LY (1990) Evidence for the formation of hetero-multimeric potassium channels in Xenopus oocytes. Nature 345(6275):530-4

[42] Ishii TM, Maylie J, Adelman JP (1997) Determinants of Apamin and d-Tubocurarine Block in SK Potasium Channels. J Biol Chem 272(37):23195-200

[43] Jäger H, Adelman JP, Grissmer S (2000) SK2 encodes the apamin-sensitive $Ca^{2+}$-activated $K^+$ channels in the human leukemic T cell line, Jurkat. FEBS Lett 469:196-202

[44] Jan LY, Jan YN (1997) Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. J Physiol 505(2): 267-82

[45] Jensen BS, Ødum N, Koschmieder-Jørgensen N, Christophersen P, Olesen S-P (1999) Inhibition of T cell proliferation by selective block of $Ca^{2+}$-activated $K^+$ channels. PNAS 96:10917-21

[46] Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K+ channel. Nature 423(6935):33-41

[47] Kaczorowski GJ, Garcia ML (1999) Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. Curr Opin Chem Biol 3:448-458

[48] Kalman K, Pennington MW, Lanigan MD, Nguyen A, Rauer H, Mahnir V, Paschetto K, Kem WR, Grissmer S, Gutman GA, Christian EP, Cahalan MD, Norton RS, Chandy KG (1998) ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. J Biol Chem 273(49):32697-707

[49] Kay BK, Kasanov J, Yamabhai M (2001) Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries. Methods 24(3):240-6

[50] Keen JE, Khawaled R, Farrens DL, Neelands T, Rivard A, Bond CT, Janowsky A, Fakler B, Adelman JP, Maylie J (1999) Domains Responsible for Constitutive and $Ca^{2+}$-Dependent Interactions between Calmodulin and Small Conductance $Ca^{2+}$-Activated Potassium Channels. J Neurosci 19(20):8830-38

[51] Khanna R, Chang MC, Joiner WJ, Kaczmarek LK, Schlichter LC (1999) hSK4/hIK1, a Calmodulin-binding $K_{Ca}$ Channel in Human T Lymphocytes. J Biol Chem 274(21):14838-49

[52] Koo GC, Blake JT, Talento A, Nguyen M, Lin S, Sirotina A, Shah K, Mulvany K, Hora D Jr, Cunningham P, Wunderler DL, McManus OB, Slaughter R, Bugianesi R, Felix J, Garcia M, Williamson J, Kaczorowski G, Sigal NH, Springer MS, Feeney W (1997) Blockage of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. J Immunol 158(11):5120-8

[53] Koschak A, Bugianesi RM, Mitterdorfer J, Kaczorowski GJ, Garcia ML, Knaus H-G (1998) Subunit Composition of Brain Voltage-gated Potassium Channels Determined by Hongotoxin-1, a Novel Peptide Derived from Centruroides limbatus Venom. J Biol Chem 273(5):2639-44

[54] Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(259):680-5

[55] Larsson HP, Baker OS, Dhillon DS, Isacoff EY (1996) Transmembrane movement of the Shaker K+ channel S4. Neuron 16(2):387-97

[56] Legros C, Albers F, Martin-Euclaire MF, Garcia ML, Pongs O (2004) Characterizing the hongotoxin 1 binding site using KcsA-Kv1.X chimeric channels. (In Vorbereitung)

[57] Legros C, Pollmann V, Knaus H-G, Farrell AM, Darbon H, Bougis PE, Martin-Eauclaire M-F, Pongs O (2000) Generating a High Affinity Scorpion Toxin Receptor in KcsA-Kv1.3 Chimeric Potassium Channel. J Biol Chem 275(22):16918-24

[58] Legros C, Schulze C, Garcia ML, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF, Pongs O (2002) Engineering specific pharmacological binding sites for peptidyl inhibitors of potassium channles into KcsA. Biochemistry 41(51):15369-75

[59] Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K (1999) Voltage-gated ion channels and hereditary disease. Physiol Rev 79(4):1317-72

[60] Lew A, Chamberlin R (1999) Blockers of human T cell Kv1.3 potassium channels using de novo ligand design and solid-phase parallel combinatorial chemistry. Bioorg Med Chem Lett 9:3267-72

[61] Lewis RS, Cahalan MD (1990) Ion Channels and Signaltransduction in Lymphocytes. Annu Rev Physiol 52:415-30

[62] Lewis RS, Cahalan MD (1995) Potassium and calcium channels in lymphocytes. Annu Rev Immunol 13:623-53

[63] Li M, Jan YN, Jan LY (1992) Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. Science 257(5074):1225-30

[64] Macherey and Nagel (1998) Nucleobond AX Properties and Aplications

[65] MacKinnon R (1991) New insights into the structure and function of potassium channels. Curr Opin Neurobiol 1(1):14-9

[66] MacKinnon R, Cohen SL, Kuo A, Lee A, Chait BT (1998) Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. Science 280(5360):106-9

[67] McCormack T, McCormack K, Nadal MS, Vieira E, Ozaita A, Rudy B (1999) The Effects of Shaker β-Subunits on the Human Lymphocyte $K^+$ Channel Kv1.3. J Biol Chem 274(29):20123-26

[68] Mix E, Stefan K, Hoppner J, Klauer T, Zettl UK, Strauss U, Meyer-Rienecker HJ, Rolfs A (2003) Lymphocyte subpopulations, oxidative burst and apoptosis in peripheral blood cells of patients with multiple sclerosis-effect of interferon-beta. Autoimmunity 36(5):291-305

[69] Motulsky H (1995-96) The GraphPad Guide to Analyzing Radioligand Binding Data, GarphPad Software, Inc.

[70] Motulsky H (1998) How to analyze homologous competitive binding curves, GraphPad Software, Inc.

[71] New England BioLabs (2003) Ph.D.-7™ Phage Display Peptide Library Kit handbook

[72] Panyi G, Deutsch C (1996) Assembly and suppression of endogenous Kv1.3 channels in human T cells. J Gen Physiol 107(3):409-20

[73] Panyi G, Gáspár R, Krasznai Z, ter Horst JJ, Ameloot M, Aszalós A, Steels P, Damjanovich S (1996) Immunosuppressors Inhibit Voltage-Gated Potasium Channels in Human Peripheral Blood Lymphocytes. Biochem Biophys Res Commun 221:254-58

[74] Papazian DM, Timpe LL, Jan YN, Jan, LY (1991) Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channels by mutation in the S4 sequence. Nature 349(6307):305-10

[75] Perozo E, Cortes DM, Cuello LG (1998) Three-dimensional architecture and gating mechanism of a K+ channel studied by EPR spectroscopy. Nature Structural Biology 5(6):459-69

[76] Pharmacia Biotech (1997) GFX DNA Purification Kit handbook

[77] Phipps DJ, Branch DR, Schlichter CC (1996) Chloride-channel block inhibits T lymphocyte activation and signalling. Cell Signal 8(2):141-9

[78] Pongs O (1993) Structure-function studies on the pore of potassium channels. J Membr Biol 136(1):1-8

[79] Pongs O (1997) Strukturmerkmale Kalium-selektiver Ionenkanäle. Biospektrum 3:21-26

[80] Pongs O (1999) Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. FEBS Lett 452(1-2):31-35

[81] Premack BA, McDonald TV, Gardner P (1994) Activation of Ca2+ current in Jurkat T cells following the depletion of Ca2+ stores by microsomal Ca(2+)-ATPase inhibitors. J Immunol 152(11):5226-40

[82] Promega (2001) Wizard®plus miniprep DNA Purification System Manual

[83] Qiagen (1999) The QIAexpressionist handbook

[84] Ranganathan R, Lewis JH, MacKinnon R (1996) Spatial localization of the potassium channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. Neuron 16(1):131-9

[85] Rauer H, Pennington M, Cahalan MD, Chandy KG (1999) Structural Conservation of the Pores of Calcium-activated and Voltage-gated Potassium Channels Determined by a Sea Anemone Toxin. J Biol Chem 274(31):21885-92

[86] Robertson B (1997) The real life of voltage-gated K+ channels: more than model behavior. Trends Pharmacol Sci 18(12):474-83

[87] Rudy B (1988) Diverstity and ubiquity of K channels. Neuroscience 25(3).729-49

[88] Ruppersberg JP, Schroter KH, Sahmann B, Stocker M, Sewing S, Pongs O (1990) Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium channels. Nature 345(6275):535-7

[89] Ruta V, Jiang Y, Lee A, Chen J, MacKinnon R (2003) Functional analysis of an archaebacterial voltage-dependent K+ channel. Nature 422(6928):180-5

[90] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with Thermostable DNA Polymerase. Science 239(4839):487-491

[91] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

[92] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA Sequencing with chainterminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-67

[93] Schrempf H, Schmidt O, Kummerlen R, Hinnah S, Muller D, Betzler M, Steinkamp T, Wagner R (1995) A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from Streptomyces lividans. EMBO J 14(21):5170-8

[94] Shen NV, Chen X, Boyer MM, Pfaffinger PJ (1993) Deletion analysis of K+ channel assembly. Neuron 11(1):67-76

[95] Stratagene (1996) QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit Handbook

[96] Strauss U, Wissel K, Jung S, Wulff H, Hansel W, Zhu J, Rolfs A, Mix E (2000) K(+) channel-blocking alkoxypsoralens inhibit the immune response of encephalitogenic T line cells and lyphocytes from Lewis rats challenged for experimental autoimmune encephalomyelitis. Immunopharmacology 48(1):51-63

[97] Swillens S (1995) Interpretation of binding curves obtained with high receptor concentrations: practical aid for computer analysis. Mol Pharmacol 47(6):1197-203

[98] Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A (1995) Mode of action of tacrolimus FK506: molecular and cellular mechanism. Ther Drug Monit 17(6):584-91

[99] Towbin H, Staekelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76(9):4350-4

[100] Wei A, Jegla T, Salkoff L (1996) Eight potassium channel families revealed by the C.elegans genome project. Neuropharmacology 35(7):805-29

[101] Wilson DR, Finlay BB (1998) Phage display: applications, innovations, and issues in phage host biology. Can J Microbiol 44(4):313-29

[102] Wilson GF, Kaczmarek LK (1993) Mode-switching of a voltage-gated cation channel is mediated by a protein kinase A-regulated tyrosine phosphatase. Nature 366(6454):433-8

[103] Wrisch A, Grissmer S (2000) Structural differences of bacterial and mammalian $K^+$ channels. J Biol Chem 275(50):39345-53

[104] Yellen G (1999) The bacterial K+ channel structure and its implications for neuronal channels. Curr Opin Neurobiol 9:267-73

# IX Anhang

## 1. Lösungen und Puffer

( in alphabetischer Reihenfolge)

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Lösungen mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| AP-Puffer | 50 | mM | Tris-HCl, pH 8,5 | |
| (*Dephosphorylierung*) | 100 | mM | EDTA | |
| BAK-Puffer | 150 | mM | KCl, | pH 7,0 |
| (*Proteinaufreinigung*) | 50 | mM | MOPS | |
| BBK-Puffer | 150 | mM | KCl, | pH 7,0 |
| (*Proteinaufreinigung*) | 39 | mM | $NaH_2PO_4$ | |
| | 61 | mM | $Na_2HPO_4$ | |
| BBK 40-Puffer | 40 | mM | DM in BBK-Puffer, | pH 7,0 |
| (*Proteinaufreinigung*) | | | | |
| BBK I 30-Puffer | 30 | mM | Imidazol, | pH 7,8 |
| (*Proteinaufreinigung*) | 4 | mM | DM in BBK-Puffer | |
| BBK I 400-Puffer | 400 | mM | Imidazol, | pH 7,0 |
| (*Proteinaufreinigung*) | 4 | mM | DM in BBK-Puffer | |
| BBK 4-Puffer | 4 | mM | DM in BBK-Puffer, | pH 7,0 |
| (*Proteinaufreinigung*) | | | | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Blockpuffer (*Western Blot*) | 5 | %(w/v) | Milchpulver in PBS |
| Blotpuffer (*Western Blot*) | 25 | mM | Tris |
| | 192 | mM | Glycin |
| | 10 | %(v/v) | Methanol |
| | 0,01 | %(w/v) | SDS |
| Detektionslösung I (*Western Blot*) | 2,5 | mM | Luminol (3-Aminophthalhydrazid) |
| | 0,4 | mM | p-Cumarsäure in DMSO |
| | 0,1 | M | Tris-HCl, pH 8,5 |
| Detektionslösung II (*Western Blot*) | 0,02 | %(v/v) | $H_2O_2$ |
| | 0,1 | M | Tris-HCl, pH 8,5 |
| DNA-Probenpuffer (5x) (*DNA-Gele*) | 20 | %(w/v) | Ficoll |
| | 100 | mM | EDTA |
| | 0,025 | %(w/v) | Bromphenolblau |
| | 0,025 | %(w/v) | Xylenxyanol |
| dNTP-Stammlösung (*PCR*) | 20 | mM | pro dATP, dCTP, dGTP, dTTP |
| Entfärbelösung (Protein-Gele) | 10 | %(v/v) | Essigsäure |
| | 45 | %(v/v) | Ethanol |
| Ethidiumbromid-Lösung (*DNA-Gele*) | 10 | mg/ml | Ethidiumbromid |
| Färbelösung (*Protein-Gele*) | 45 | %(v/v) | Ethanol |
| | 10 | %(v/v) | Essigsäure |
| | 0,15 | %(w/v) | Serva Blue R250 |
| | vor Gebrauch filtriert mit Watman N°1 | | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Filter-Inkubationslösung (Bindungsassays) | 0,5 | %(v/v) | PEI |
| GFX Gelelutionspuffer I: (*DNA-Reinigung*) | Pufferlösung mit Acetat und Chaotrope | | |
| GFX Waschpuffer II: (*DNA-Reinigung*) | Tris-EDTA-Puffer mit 80% Ethanol | | |
| IPTG/Xgal-Lösung (*Phagentitration*) | 0,05<br>0,04 | g/ml<br>g/ml | IPTG<br>Xgal } in Dimethylformamid |
| Jodit-Puffer (*Phagen-DNA-Reinigung*) | 10<br>1<br>4 | mM<br>mM<br>M | Tris-HCl, pH 8,0<br>EDTA<br>NaCl |
| Laufpuffer (*FPLC-Säulenchromatographie*) | | | BBK, entgast |
| Laufpuffer (*Protein-Gele*) | 25<br>192<br>0,1 | mM<br>mM<br>%(w/v) | Tris-HCl<br>Glycin<br>SDS |
| Ligationspuffer (10x) | 200<br>100<br>100<br>6 | mM<br>mM<br>mM<br>mM | Tris-HCl, pH 7,9<br>$MgCl_2$<br>Dithiothreitol (DTT)<br>ATP |
| Lösung I<br>Zell-Resuspensionspuffer (*Plasmidisolierung*) | 50<br>10<br>100 | mM<br>mM<br>µg/ml | Tris-HCl, pH 7,5<br>EDTA<br>RNase A |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Lösung II | 0,2 | M | NaOH | |
| Zell-Lyse-Lösung | 1 | %(w/v) | SDS | |
| (*Plasmidisolierung*) | | | | |
| Lösung III | 1,32 | M | Kaliumacetat, pH 4,8 | |
| Neutralisationslösung | | | | |
| (*Plasmidisolierung*) | | | | |
| Lösung IV | 80 | mM | Kaliumacetat | |
| Säulenwaschlösung | 8,3 | mM | Tris-HCl, pH 7,5 | |
| (*Plasmidisolierung*) | 40 | µM | EDTA | |
| | 55 | %(v/v) | Ethanol | |
| Lösung V | Whizard® Miniprep DNA Purification Resin | | | |
| (*Plasmidisolierung*) | | | | |
| Membran-Bindungspuffer | 20 | mM | Tris, | pH 7,4 |
| (Bindungsassays) | 50 | mM | NaCl | |
| | 0,1 | %(w/v) | BSA (Sigma Fraktion V) | |
| $Mg^{2+}$-Lösung | 1 | M | $MgCl_2$ | |
| (*kompetente Bakterien*) | 1 | M | $MgSO_4$ | |
| Miller-Succrose-Puffer | 39 | mM | $NaH_2PO_4$, | pH 7,0 |
| (*Bakterienmembran* | 61 | mM | $Na_2HPO_4$ | |
| *-Aufbewahrung*) | 5 | mM | NaCl | |
| | 200 | mM | Succrose | |
| PBS (20x) | 3 | M | NaCl | |
| (Proteinaufreinigung) | 161 | mM | $Na_2HPO_4$ | |
| | 39 | mM | $KH_2PO_4$ | |
| PEG/NaCl | 20 | %(w/v) | Polyethylen-Glykol 8000 | |
| (*Phagen-Prezipitation*) | 2,5 | M | NaCl | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Probenpuffer (2x) | 250 | mM | Tris-HCl, pH 6,8 |
| (Laemmli) | 5 | %(w/v) | SDS |
| (*Protein-Gele*) | 10 | %(w/v) | β-Mercaptoethanol |
| | 20 | %(v/v) | Glycerin |
| | 0,5 | %(w/v) | Bromphenolblau |
| Proteinase-Inhibitoren | 200 | mM | PMSF in Ethanol |
| (*Bakterienaufschluss*) | 10 | mM | Leupeptin in $H_2O$ |
| | 1 | mM | Pepstatin in Methanol |
| Puffer N2 | 100 | mM | Tris-$H_3PO_4$, pH 6,3 |
| (*Plasmidisolierung*) | 15 | %(v/v) | Ethanol |
| | 0,9 | M | KCl |
| Puffer N3 | 100 | mM | Tris-$H_3PO_4$, pH 6,3 |
| (*Plasmidisolierung*) | 15 | %(v/v) | Ethanol |
| | 1,15 | M | KCl |
| Puffer N5 | 100 | mM | Tris-$H_3PO_4$, pH 8,5 |
| (*Plasmidisolierung*) | 15 | %(v/v) | Ethanol |
| | 1 | M | KCl |
| Puffer S1 | 50 | mM | Tris-HCl, pH 8,0 |
| (*Plasmidisolierung*) | 10 | mM | EDTA |
| | 100 | µg/ml | RNase A |
| Puffer S2 | 0,2 | M | NaOH |
| (*Plasmidisolierung*) | 1 | %(w/v) | SDS |
| Puffer S3 | 2,8 | M | Kaliumacetat, pH 5,1 |
| (*Plasmidisolierung*) | | | |
| Restriktionspuffer | Vom Hersteller der Restriktionsenzyme gelieferte Puffer | | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Sammelgelpuffer (4x)0,5 | M | | Tris-HCl, pH 6,8 | |
| (*Protein-Gele*) | 0,4 | %(w/v) | SDS | |
| | | | | |
| TAE (50x) | 2 | M | Tris-Acetat, pH 8,0 | |
| (*DNA-Gele*) | 100 | mM | EDTA | |
| | | | | |
| TB-Puffer | 3 | g/l | PIPES | |
| (*kompetente Bakterien*) | 15 | mM | $CaCl_2$ | |
| | 250 | M | KCl | |
| | 10,88 | g/l | $MgCl_2$ | |
| | | | steril filtriert | |
| | | | | |
| TE-Puffer (10x) | 0,1 | M | Tris-HCl, pH 7,5 | |
| | 10 | mM | EDTA | |
| | | | | |
| Trenngelpuffer (4x) | 1,5 | M | Tris-HCl, pH 8,8 | |
| (*Protein-Gele*) | 0,4 | %(w/v) | SDS | |
| | | | | |
| Protein-Bindungspuffer | 20 | mM | Tris, | pH 7,4 |
| (Bindungsassays) | 50 | mM | NaCl | |
| | 0,1 | %(w/v) | BSA (Sigma Fraktion V) | |
| | 2 | mM | DM | |
| | | | | |
| Waschpuffer | 10 | %(w/v) | PEG | pH 7,4 |
| (Bindungsassays) | 20 | mM | Tris | |
| | 10 | mM | $MgCl_2$ | |

## 2. Nährmedien

(Nährmedien wurden autoklaviert, Antibiotika wurden den Medien nach deren Abkühlung zugesetzt.)

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Agarose-Top | 10 | g/l | Bacto-Trypton | |
| (*Phagentitration*) | 5 | g/l | Hefeextrakt | |
| | 5 | g/l | NaCl | |
| | 1 | g/l | $MgCl_2/6\ H_2O$ | |
| | 7 | g/l | Agarose | |
| LB/Amp-Medium | 100 | mg/l | Ampicillin in LB-Medium | |
| LB/Amp/Kana-Medium | 100 | mg/l | Ampicillin } in LB-Medium | |
| | 25 | mg/l | Kanamycin } | |
| LB/Amp-Platten | 20 | g/l | Agar in LB-Medium | |
| | 100 | mg/l | Ampicillin | |
| LB/Amp/Kana-Platten | 20 | g/l | Agar in LB-Medium | |
| | 100 | mg/l | Ampicillin | |
| | 25 | mg/l | Kanamycin | |
| LB/IPTG/Xgal-Platten | 15 | g/l | Agar in LB-Medium | |
| (*Phagentitration*) | Nach Autoklavieren abkühlen unter 70°C und zusetzen: | | | |
| | 1 | ml | IPTG/Xgal-Lösung | |
| LB-Medium | 10 | g/l | Bacto-Trypton | pH 7,4 |
| | 10 | g/l | NaCl | |
| | 5 | g/l | Hefeextrakt | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| SOB-Medium | 20 | g/l | Bacto-Trypton, | pH 7,0 |
| | 5 | g/l | Hefeextrakt | |
| | 0,5 | g/l | NaCl | |
| | 10 | mM | KCl | |
| Superbroth (SB-Medium) | 25 | g/l | Bacto-Trypton, | pH 7,5 |
| | 15 | g/l | Hefeextrakt | |
| | 5 | g/l | NaCl | |

## 3. Bakterienstämme

*Escherichia coli* ER2738 F‘ lacl$^{q}$ Δ(lacZ)M15 proA$^{+}$B$^{+}$ zzf::Tn10(Tet$^{R}$)/fhuA2 supE thi Δ(lac-proAB) Δ(hsdMS-mcrB)5 ($r_k^-$ $m_k^-$ McrBC$^-$)
NEB

*Escherichia coli* M15pREP4 *Nal$^{S}$ Str$^{S}$ Rif$^{S}$ Thi$^-$ Lac$^-$ Ara$^+$ Gal$^+$ Mtl$^-$ F$^-$ RecA$^+$ Uvr$^+$ Lon$^+$*
QIAGEN

*Escherichia coli* XL1-*Blue* *recA1, end A1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F´proAB lacl$^{q}$ZΔM15Tn10(Tet$^{r}$)]*
Stratagene

## 4. Molekulargewichtstandards

BenchMark™ 10 blau gefärbte Banden von 10-200 kDa, 4. ist rot gefärbt
Invitrogen

| | |
|---|---|
| MW14-70 | α-Lactalbumin (14,2 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa), Trypsinogen (24 kDa), Carbonsäureanhydrase (29 kDa), Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (36 kDa), Ovalbumin (45 kDa), BSA (66 kDa) |
| | Sigma |
| Smart DNA Ladder | 14 Banden in regelmäßigen Abständen von 200-10000 bp |
| | Eurogentec |

## 5. Vektoren

| | |
|---|---|
| pQE32 | Expressionsvektor für rekombinante Proteine aus *E. coli* mit Poly-Histidin-Domäne (6x His) am N-Terminus |
| | QIAGEN |
| PQE70 | Expressionsvektor für rekombinante Proteine aus *E. coli* mit Poly-Histidin-Domäne (6x His) am C-Terminus |
| | QIAGEN |

## 6. Antikörper und Histidin-Komplexbildner

magnetische $Ni^{2+}$NTA-Agarose-Sonde

QIAGEN

$Ni^{2+}$NTA-Agarose Suspension

QIAGEN

| | |
|---|---|
| RGS His Ab | monoklonaler Antikörper aus der Maus, gerichtet gegen 6x Histidin-Tag Epitope, BSA frei<br>QIAGEN |
| Anti-Maus IgG | Meerrettich-Peroxydase gekoppelter polyklonaler Antikörper aus dem Schaf gerichtet gegen IgG-Antikörper aus der Maus<br>Amersham Biosciences |

## 7. Kanalprotein-Liganden

| | |
|---|---|
| $HgTX_1$<br>KTX | wurde von Legros et al. im pMAL™ Proteinfusions- und Proteinaufreinigungssystem (New England Biolabs) hergestellt und zur Verfügung gestellt. |
| $^{125}$I-$HgTX_1$-[A19Y/Y37F]<br>$^{125}$I-KTX | wurden vom Labor H.-G. Knaus, Institut für Biochemische Pharmakologie, Universität Innsbruck und vom Labor M.L. Garcia, Department of Membrane Biochemistry and Biophysics, Merck Research Laboratories gestellt. |

## 8. Oligonukleotide

KcsA-Ska: Overlap-PCR:

$SF_1$: 5‘-CAC CAT GGG ATC CGC ATG CCA C-3‘

$S_1$rev: 5‘-CAC ATC GCG CCC AGA AAG TTG CTG GTC ACA TCC TGC TG-3‘

$RkSK_1$: 5‘-GTT GCT GGT CAC ATC CTG CTG GTC ATG GTA GCG CTC AGC CAG GAC GGC CAA GTA CGA G-3‘

$S_2$sens: 5‘-CAA CTT TCT GGG CGC GAT GTG GTG GTC CGT GGA GAC CGC GAC GAC-3‘

Urev: 5‘-TTT AAG CTT ATC ACC GGC GGT TGT CGT CGA GCA TTC GCT CC-3‘

KcsA-Skb: QuickChange:

$SK_b$for: 5‘-CCG TCC TGG CTG AGC GCG GCG ACC AGC AGG ATG TGA CC-3‘

$SK_b$rev: 5‘-GGT CAC ATC CTG CTG GTC GCC GCG CTC AGC CAG GAC GG-3‘

KcsA-$SK_{a/b}$-F103L: Mutationselimination:

L103Fsens: 5‘-CGG GAT CAC CTC CTT CGG TCT GGT GAC CGC C-3‘

L103Frev: 5‘-GGC GGT CAC CAG ACC GAA GGA GGT GAT CCC G-3‘

Sequenzierung

QnP1: 5‘- G GTC CAG GAG GAA AAA GGC-3‘

QER: 5‘-GTT CTG AGG TCA TTA CTG G-3‘

## 9. Kontrollwachstum von E.coli $XL_1$blue

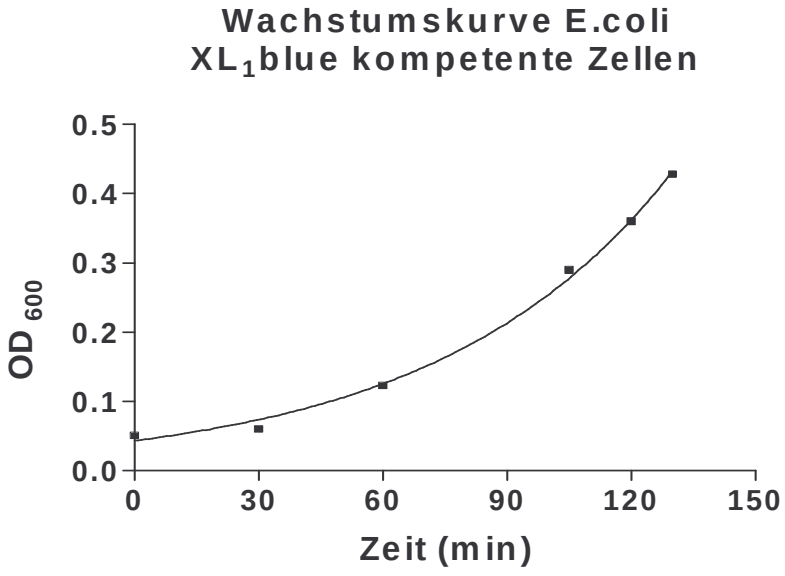



Abb. 18: Kontrollwachstumskurve nicht transformierter Bakterien E.coli $XL_1$blue

## 10. Vektoren

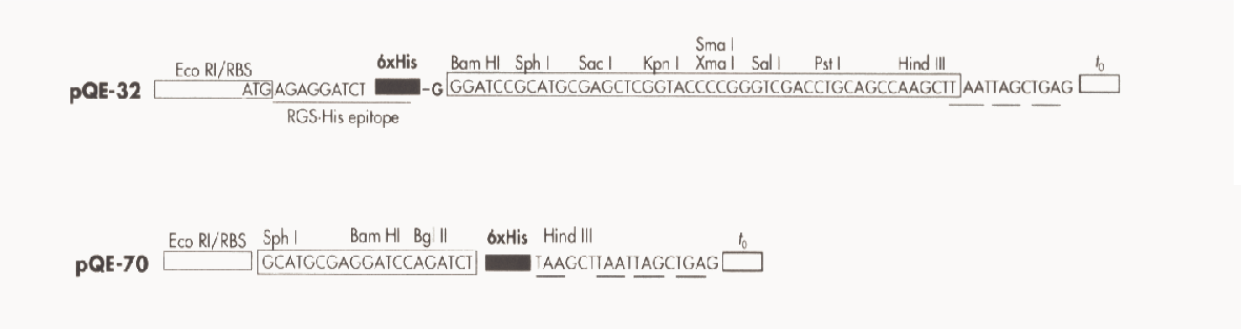



Abb. 19: Benutzte Vektoren (linearisierte Darstellung)

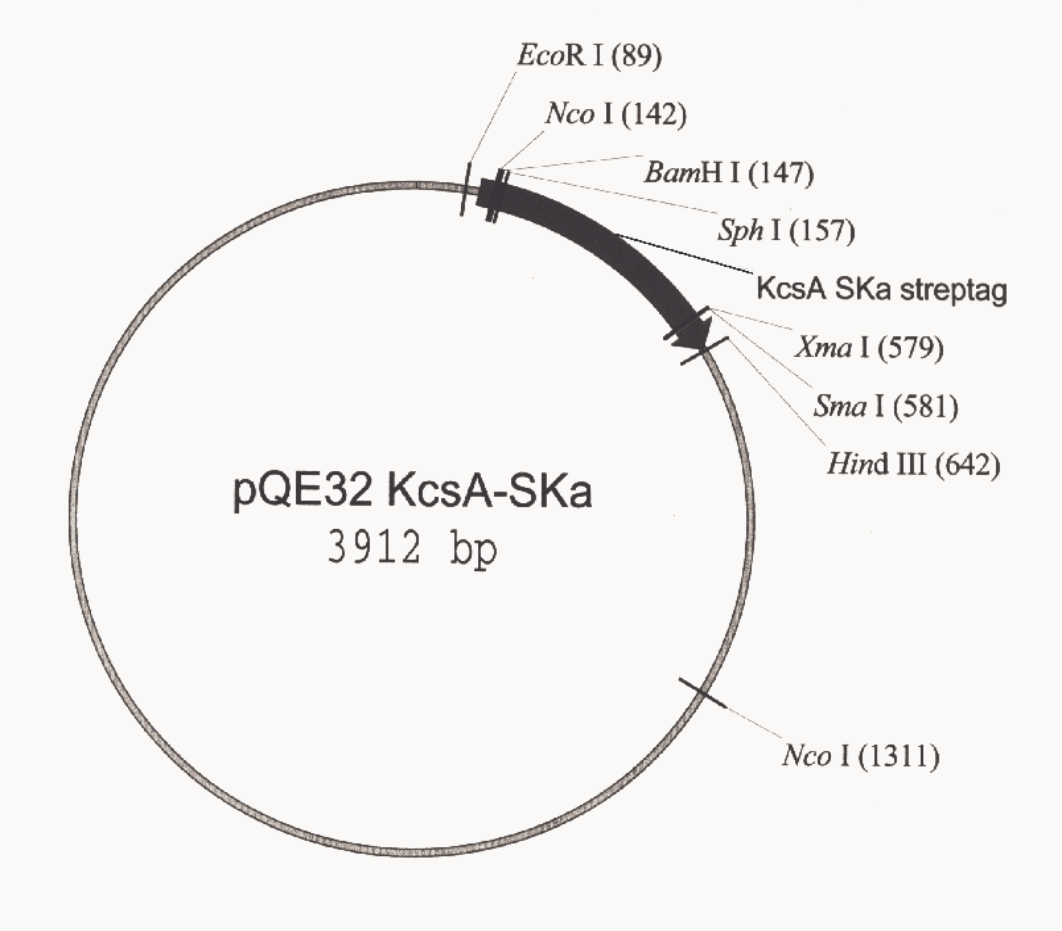



Abb. 20: Vektorkarte von pQE32-KcsA-Ska mit KcsA-Ska Insert

# Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. O. Pongs für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Institut für Neurale Signalverarbeitung am Zentrum für Molekulare Neurobiologie durchführen zu können.
Ich bedanke mich bei meinem Betreuer Dr. Christian Legros für die geduldige Einführung in das Thema und in verschiedene Arbeitstechniken sowie dafür, dass er während der Durchführung der Arbeit jederzeit ansprechbar war und mir bei Experimenten und Auswertungen ermutigend und hilfreich beiseite stand. Ebenso möchte ich mich für die Überlassung einiger Daten zur Ausführung der Diskussion bei ihm bedanken.
Außerdem danke ich Dr. H.-G. Knaus und Dr. M.-L. Garcia für die Bereitstellung radioaktiver und unmarkierter Liganden.
Mein Dank gilt ebenfalls Annette Marquardt, Iris Meier, Monika Schmidt und Andreas Nolting für die Einweisung in biochemische und molekularbiologische Arbeitstechniken.
Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die freundliche Aufnahme und die ständige Hilfsbereitschaft.

# Lebenslauf

| | |
|---|---|
| Name | Florian Albers |
| Geburtstag und –ort | 28. Mai 1973 in Hamburg |
| Eltern | Dr. Gerlinde Albers, Zahnärztin |
| | Prof. Dr. Dr. Hans-Karl Albers, Hochschullehrer |

Schulbildung

| | |
|---|---|
| 1979-1983 | Grundschule Wolfgang-Borchert-Schule in Hamburg |
| 1983-1989 | Heilwig-Gymnasium Hamburg |
| 1989-1990 | Schüleraustausch: Valley-High-School, Las Vegas, Nevada, USA |
| 1990-1993 | Heilwig-Gymnasium Hamburg |
| 16.06.1993 | Abitur |

Zivildienst

| | |
|---|---|
| 1993-1994 | Zivildienst an der Schule f. Geistigbehinderte, Lokstedter Damm in Hamburg |

Studium

| | |
|---|---|
| 1994-1996 | Biologie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen |
| 18.07.1996 | Vordiplom |
| 1996-2002 | Humanmedizin am Universitäts-Krankenhaus-Eppendorf in Hamburg |
| 19.03.2002 | 2. Staatsexamen |
| 2002-2003 | Praktisches Jahr im Klinikum-Nord und am Universitäts-Krankenhaus-Eppendorf in Hamburg |
| 17.06.2003 | 3. Staatsexamen |

Nebentätigkeiten

| | |
|---|---|
| 1999-2001 | hilfswissenschaftliche Tätigkeit am Institut für Neurale Signalverarbeitung im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg bei Prof. Dr. Pongs im Rahmen der Dissertation |

Hamburg, 01.05.2004

# Erklärung

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem anderen Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, 01.05.2004