

Philipps



Universität
Marburg

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität
Direktor: Prof. Dr. T. Gudermann

Biophysikalischer Einfluss von Kv6.1-, Kv6.3- und Kv6.4-Proteinen auf den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv2.1

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg

vorgelegt von

Lennart Skrobek
aus Worms

Marburg/Lahn 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg am: 19. Juni 2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. T. Gudermann

Korreferentin: PD Dr. R. Preisig-Müller

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1. Thema und Zielsetzung dieser Arbeit.....	1
2. Die Familie der Kaliumkanäle.....	3
2.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle	5
2.2 Aufbau und Funktionsweise der <i>Kv</i> -Kanäle	8
2.3 Die <i>hKv2</i> -Familie	13
2.4 Die <i>hKv6</i> -Familie	14
3. Abriss über die Historie der Patch-Clamp-Technik.....	16
Material und Methoden	20
1. Zellkultur.....	20
2. Transfektion	21
3. Elektrophysiologie	23
4. Messkammer.....	26
5. Perfusionssystem	27
6. Referenzelektrode.....	28
7. Pipetten	29
8. Mikromanipulator.....	32
9. Ganzzelleableitung.....	33
10. Liquid-Junction-Potential	33
11. <i>Offset</i> -ausgleich	34
12. Kompensation des Serienwiderstandes	34
13. Durchführung der Experimente	35
14. Spannungsprotokolle.....	37
15. Pipetten- und Badlösungen	39
16. Pharmaka und Salze	40

Ergebnisse	42
1. Prinzipien der Stromkurvenanalyse.....	42
2. hKv2.1	47
3. hKv6.1-IRES-hKv2.1	52
4. hKv6.3-IRES-hKv2.1	56
5. hKv6.4-IRES-hKv2.1	60
6. hKv2.1H105V	64
Diskussion	69
1. Aktivierung	70
2. Inaktivierung.....	76
3. hKv2.1H105V	82
Zusammenfassung	85
Literaturverzeichnis	91
Abkürzungen	105

Einleitung

Ein Organismus muss über bestimmte Eigenschaften und Fähigkeiten verfügen, um als Lebewesen zu gelten. Neben Kriterien wie der Fortbewegung, der Reproduktionsfähigkeit, dem Stoffwechsel und der sowohl räumlichen als auch zeitlichen Begrenzung ist die Fähigkeit, mit der Umwelt zu interagieren ein wichtiger Bestandteil der Definition einer lebenden Zelle. Gerade bei der Betrachtung des komplexen Aufbaus des tierischen und menschlichen Körpers mit seinen teilweise hochspezialisierten Organsystemen wird die Bedeutung der Kommunikationsfähigkeit der einzelnen Zellen deutlich. Ohne effiziente Signaltransduktionssysteme wie Tyrosinkinasen, G-Protein assoziierte Rezeptoren, Ionenkanäle oder Ähnlichem wären Vielzeller kaum lebens- und entwicklungsfähig. Dabei zählt bei Bakterien, Archaeobakterien und Eukaryoten die Familie der Kaliumkanäle zu den bedeutendsten Modulatoren physiologischer Regulation. Sei es bei der Magensaftsekretion, beim Aktionspotential des Herzens oder bei Lern- und Merkprozessen, Kaliumkanäle übernehmen in fast allen Zelltypen wichtige Aufgaben (*Hille*, 1992). Zudem werden veränderte Kanalfunktionen, zum Beispiel hervorgerufen durch Genmutationen, mit einigen Erkrankungen in Verbindung gebracht (*Borgatti et al.*, 2004; *Bonnet et al.*, 2007). Um die Funktions- und Arbeitsweise dieser Kanäle besser zu verstehen und modulierende Substanzen für den klinischen Einsatz zu finden, rücken Kaliumkanäle in den Mittelpunkt vieler Untersuchungen.

1. Thema und Zielsetzung dieser Arbeit

Spannungsabhängige Kaliumkanäle sind schon seit langer Zeit bekannte und untersuchte Bestandteile der Zellmembran. Durch elektrophysiologische und molekularbiologische Analysen ist dabei eine recht konkrete Vorstellung von der Struktur, Funktion und Arbeitsweise dieser hochspezialisierten Moleküle

entstanden. Dennoch sind viele Phänomene wie Variantenreichtum und elektrophysiologische Anpassung der Kanaleigenschaften an die verschiedenen Aufgaben in den zahlreichen, unterschiedlichen Zelltypen bislang ungeklärt. Da man sie in fast jedem Organsystem des Menschen antreffen kann und ihr Aufgabengebiet ein erstaunlich breites Spektrum abdeckt, kann die Vielfalt der Funktionen nicht allein durch die zwölf bekannten Familien erklärt werden. Zudem sind nur die Mitglieder der ersten vier Familien *hKv1* bis *hKv4* in der Lage funktionsfähige Proteinkomplexe zu bilden (*Gutman et al.*, 2005). Die Zelle muss also über weitere Möglichkeiten verfügen die Kanaleigenschaften zu modifizieren und an die gegebenen Aufgaben anzupassen. Mechanismen wie alternatives Spleißen, posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung oder Anlagerung akzessorischer, modulierender Proteine spielen hier eine Rolle. In den letzten Jahren treten jedoch Untersuchungen einer weiteren Modifikationsmöglichkeit in den Vordergrund: der Vorgang der Multimerisierung und seine Bedeutung für Kanalzusammensetzung und elektrophysiologische Eigenschaften. So konnte gezeigt werden, dass Untereinheiten sowohl mit anderen Mitgliedern der eigenen Familie als auch mit Vertretern von ansonsten stummen, nichtleitenden Subklassen assemblieren und funktionstüchtige Kanalproteine mit teils deutlich unterschiedlichen Eigenschaften bilden (*Kramer et al.*, 1998, *Kerschensteiner et al.*, 1999).

Diese Arbeit untersuchte die Effekte der γ -Proteine *hKv6.1*, *hKv6.3* und *hKv6.4* auf die grundlegenden biophysikalischen Eigenschaften des *hKv2.1*-Kanals mit elektrophysiologischen Methoden. Dazu entstanden *in vitro* durch Kotransfektion der kodierenden Gensequenzen heteromultimere Kanalproteine, welche untereinander und mit dem homotetrameren *hKv2.1* verglichen werden konnten.

Zusätzlich standen sogenannte *hKv2.1H105V*-Gensequenzen für Untersuchungen zur Verfügung. Die N-terminale T1-Domäne bei spannungsabhängigen Kaliumkanälen ist für die Tetramerisierung und Proteininteraktion verantwortlich (*Gulbis et al.*, 2000). Im *hKv2.1*-Protein ist die Aminosäure Histidin an Position 105 Teil dieser Domäne. Zusammen mit drei Cysteinresten vermittelt sie über koordinative Bindung von Zinkionen die Erkennung und Anlagerung der vier Untereinheiten zum arbeitenden tetrameren

Ionenkanal (*Bixby et al.*, 1999). Durch gezielte Mutagenese konnte die Gensequenz des *hKv2.1* durch eine Punktmutation so verändert werden, dass an Stelle der Aminosäure Histidin in Position 105 die Aminosäure Valin ins Kanalprotein eingebaut wird. Die Untersuchungen dieses *hKv2.1H105V*-Kanals im Vergleich zu *hKv6.4-IRES-hKv2.1H105V*-Konstrukten lieferten Hinweise auf die Bedeutung der betreffenden Aminosäure beim Tetramerisierungsvorgang.

Die vorliegende Arbeit ist damit ein Beitrag zum besseren Verständnis des Mechanismus und der funktionellen Bedeutung der Multimerisierung bei spannungsabhängigen Kaliumkanälen.

Im folgenden Abschnitt werden dazu die grundlegenden Charakteristika der untersuchten, spannungsabhängigen Kaliumkanäle vorgestellt und ein kurzer historischer Abriss zu den verwendeten elektrophysiologischen Untersuchungsmethoden gegeben. Das Material und Methoden Kapitel beschreibt ausführlich die Versuchsanordnung und Vorgehensweise der einzelnen Experimente. Die Ergebnisse werden dann zunächst gesondert präsentiert um im letzten Teil dieser Arbeit vergleichend analysiert, interpretiert und diskutiert zu werden.

2. Die Familie der Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind in fast allen Zelltypen repräsentiert und bestimmen maßgeblich grundlegende biologische Eigenschaften. Insbesondere die Höhe des Membranpotentials und damit die elektrische Erregbarkeit der Zelle hängen vom Aktivitätslevel der Kaliumkanäle ab. Ein weiterer Aufgabenbereich umfasst den Vorgang der Repolarisation mit seiner außerordentlich wichtigen Bedeutung für den programmierten, schablonenhaften Ablauf des Aktionspotentials. Form und Dauer der Repolarisation entscheiden über Refraktärzeit bis zum nächstmöglichen Aktivierungszeitpunkt und Ausmaß der Aktivierung der Zelle beispielsweise bei der myozytären Kontraktion. Aufgrund dieser essentiellen Beteiligung an Muskelkontraktionen, Hormonsekretion, neuronaler Leitung oder Bildung des Herzrhythmus sind Kaliumkanäle prinzipiell für jede Bewegung und Empfindung unabdingbar.

Kaliumkanäle stellen integrale Membranproteine dar, die Kaliumionen mit Geschwindigkeitsraten von 10^6 bis 10^8 Ionen pro Sekunde entlang eines elektrochemischen Gradienten durch eine Membran leiten können (Hille, 1992). Die intrazelluläre Kaliumionenkonzentration übertrifft die extrazelluläre fast um das dreißigfache, so dass der Ionenfluss meist von innen nach außen verläuft. Es existieren jedoch auch Kaliumkanäle, deren Nettostromfluss von außen nach innen gerichtet ist. Diese werden als einwärtsgerichtete Kanäle oder im Englischen als *inward-rectifier* bezeichnet. Aktivierungssignale, die zur Öffnung eines Kaliumkanals führen, umfassen Änderungen des Membranpotentials oder der intrazellulären Kalziumkonzentration oder werden über mechanische Reize oder G-Proteine vermittelt. Dementsprechend unterteilt man Kaliumkanäle in spannungsabhängige, kalziumaktivierte, G-Protein-gesteuerte oder mechanisch aktivierbare Typen.

Die hochspezifische Selektivität für Kalium wird durch einen Filter erreicht, der für dehydratisierte Kaliumionen ideale Raum- und Ladungsverhältnisse schafft. Die Sauerstoffatome der Carbonylgruppe des Polypeptid-Rückgrates sind so ausgerichtet, dass sie die Sauerstoffatome der Wasserhülle um ein Kaliumion imitieren können (Morais-Cabral et al., 2001). Die für die Porenpassage notwendige Dehydratisierung gestaltet sich so für Kaliumionen energetisch wesentlich günstiger als für andere Kationen. Unmittelbar hinter dem Porenbereich werden die gefilterten Ionen sofort wieder mit einer Hydrathülle versehen und aus dem Filterbereich entfernt. Verschiedene Inaktivierungsprozesse führen in der Folge wieder zu einer Schließung der Ionenpore.

Zur Bildung eines funktionstüchtigen Kanalproteins werden vier oft identische Grundbausteine benötigt, die als α -Untereinheiten bezeichnet werden und eine Einteilung der Kaliumkanäle in drei Superfamilien erlauben. Die einwärts-gerichteten (*inward-rectifier*) Kanäle bestehen aus vier α -Untereinheiten mit jeweils zwei transmembranären Segmenten und einer porenbildenden Region und können Kaliumionen von extra- nach intrazellulär leiten. Eine weitere Gruppe von Kanälen setzt sich aus α -Untereinheiten mit vier transmembranären Anteilen und einer „Tandempore“, bestehend aus zwei porenbildenden Regionen, zusammen. Sie besitzen ebenfalls schwache

inward-rectifier-Eigenschaften. Die α -Untereinheiten der zahlreichen übrigen Kaliumkanäle bestehen aus sechs transmembranären Segmenten und einer porenbildenden Region. Jeweils vier dieser α -Untereinheiten sind in einem Tetramer zusammengeschlossen und bilden einen funktionstüchtigen Kanal. Zu dieser Superfamilie gehören auch die spannungsabhängigen *Kv*-Kanäle (*voltage-gated*) und die mit Kalzium aktivierbaren *KCa*-Kanäle (*Gutman et al.*, 2005).

2.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle

In der Familie der Kaliumkanäle bilden die spannungsabhängigen Exemplare die umfangreichste Gruppe. Beim Menschen konnten bis heute über 40 verschiedene Gene identifiziert werden, die sich am Aufbau der einzelnen Varianten der *Kv*-Kanäle beteiligen. Die erste Gensequenz eines spannungsabhängigen Kaliumkanals konnte dabei aus einer Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* isoliert werden. Da man bei narkotisierten Exemplaren dieser Mutante schüttelnde Beinbewegungen beobachtete, wurde der erste beschriebene Kaliumkanal nach dem englischen Wort für schütteln benannt: *Shaker*. Durch vergleichende Genanalysen konnten dann drei weitere Arten von Kaliumkanälen bei der Fruchtfliege identifiziert werden, die entsprechend ihrer Genlokalisierung die Bezeichnungen *Shab*, *Shaw* und *Shal* erhielten (*Wei et al.*, 1990). Auf Grundlage von Sequenzhomologien zu diesen Kaliumkanälen werden die *Kv*-Kanäle in vier Subfamilien unterteilt: *Kv1* (*Shaker*), *Kv2* (*Shab*), *Kv3* (*Shaw*) und *Kv4* (*Shal*). Die einzelnen Mitglieder dieser Familien können neben Homotetrameren auch heterotetramere Kanäle mit anderen α -Untereinheiten ihrer Subfamilien bilden (*Ruppertsberg et al.*, 1990). Dadurch verändern sich die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften und die Kanalvielfalt erhöht sich beträchtlich.

Neben den *Kv1*- bis *Kv4*-Kanälen existieren mit *Kv5* bis *Kv12* weitere Familien mit jeweils mehreren Mitgliedern. Diese Proteine sind jedoch nicht in der Lage durch Homotetramerisierung funktionsfähige Kanäle zu bilden. Erst als Heterotetramer mit α -Untereinheiten der Subfamilien *Kv1* bis 4 entstehen

arbeitende Kaliumkanäle (Ottshytsch, 2002). Mitglieder dieser Familien werden deshalb auch als γ -Proteine bezeichnet und übernehmen *in vivo* vermutlich die Aufgabe regulatorischer Untereinheiten. Die Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen Subklassen der spannungsabhängigen Kaliumkanäle kann man aus Abbildung 1.1 und 1.2 entnehmen.

Neben den α - und γ -Untereinheiten können sogenannte β -Proteine am Kanalaufbau beteiligt sein. Sie assoziieren mit den porenformenden α - und γ -Elementen und können Einfluss auf Funktion und Expression der Kanäle nehmen. Schon länger bekannt sind drei Familien von β -Untereinheiten (*Kv β 1–3*, Pongs *et al.*, 1999), die in 1:1-Stöchiometrie mit Kanälen aus der *Kv1*-Familie interagieren. Sie binden dabei an das N-terminale Ende der α -Untereinheiten und können *Kv1*-Kanälen ein neues Expressionsmuster verleihen oder das Inaktivierungsverhalten beeinflussen (Sewing *et al.*, 1996).

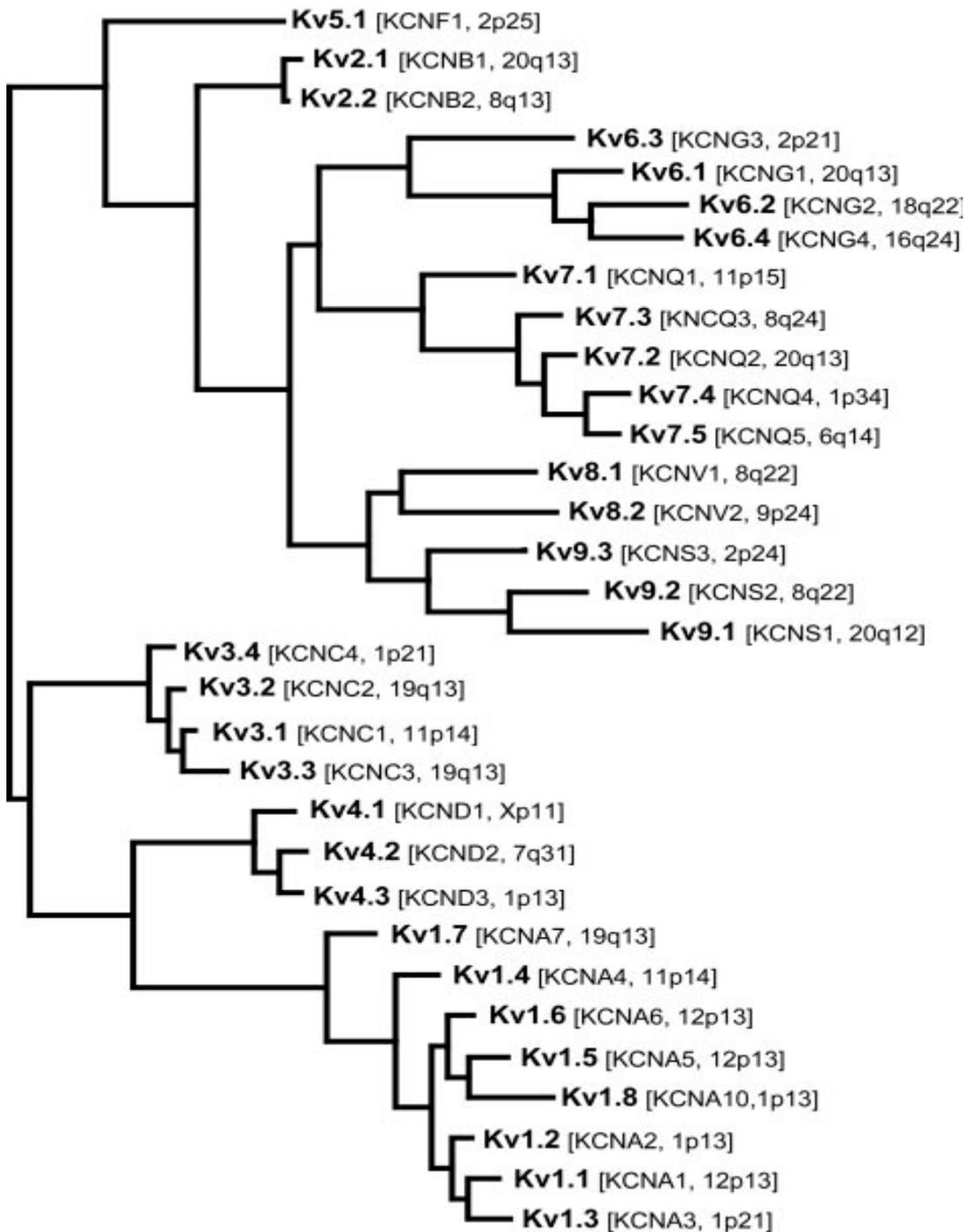


Abb. 1.1: Phylogenetischer Stammbaum der Kv-Familien 1 bis 9 nach der *International Union of Pharmacology* LIII., 2005. Grundlage sind Homologievergleiche der transmembranären Aminosäuresequenzen. In Klammern werden die Bezeichnungen nach der Nomenklatur der *Human-Genome-Organisation*, alternativ gebräuchliche Bezeichnungen und der Genlocus angegeben (Quelle: *Gutman et al.*, 2005).

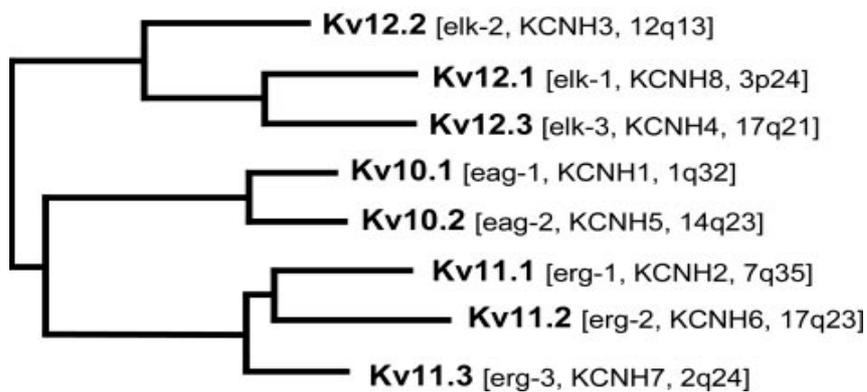


Abb. 1.2: Phylogenetischer Stammbaum der Kv-Familien 10 bis 12 nach der *International Union of Pharmacology LIII.*, 2005. Grundlage sind Homologievergleiche der transmembranären Aminosäuresequenzen. In Klammern werden die Bezeichnungen nach der Nomenklatur der *Human-Genome-Organisation*, alternativ gebräuchliche Bezeichnungen und der Genlocus angegeben (Quelle: *Gutman.et al.*, 2005).

2.2 Aufbau und Funktionsweise der Kv-Kanäle

Alle spannungsabhängigen Kaliumkanäle sind aus vier Untereinheiten mit jeweils sechs transmembranären α -Helices aufgebaut, die mit S1 bis S6 bezeichnet werden. Sowohl das N-terminale Ende von S1 als auch der C-Terminus an S6 befinden sich intrazellulär (*Yellen*, 2002). Der N-Terminus ist für Protein-Protein-Interaktionen zum Beispiel mit den modifizierenden β -Molekülen verantwortlich und trägt eine Domäne, die die Tetramerisierung der vier Untereinheiten vermittelt (*Gulbis et al.*, 2000). Bei den Kv-Typen 2 bis 4 konnte in dieser auch als T1-Domäne bezeichneten Region das hochkonservierte Motiv $HX_5CX_{20}CC$ (wobei X für eine variable Aminosäure steht) nachgewiesen werden. Über koordinative Bindung eines Zinkions an die Aminosäure Histidin und drei Cysteinreste verschiedener α -Untereinheiten erfolgt die Assemblierung der beteiligten Proteine zum Kanaltetramer (*Bixby et al.*, 1999). Dieser Vorgang gilt als spezifisches Identifikationssignal der verschiedenen Subfamilien im Homo- und Heteromultimerisierungsvorgang (*Xu et al.*, 1995; *Shen et al.*, 1993) und findet bereits im endoplasmatischen Retikulum mit noch an die Ribosomen assoziierten Proteinketten statt (*Lu*,

2001). Die Bildung funktionsfähiger Kanäle ist zwar prinzipiell auch ohne T1-Domäne möglich, indem die transmembranären Anteile der Untereinheiten direkt assemblieren, jedoch sind Expressionsrate und Effektivität der Kanalentstehung dann deutlich reduziert (Tu et al., 1996; Deutsch, 2002).

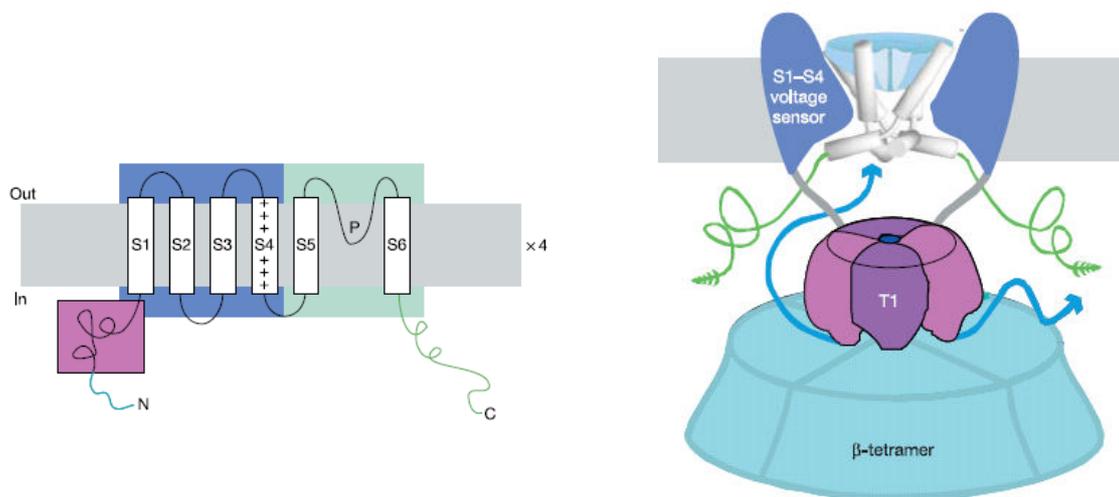


Abb. 1.3: Aufbau eines spannungsabhängigen Kaliumkanals. Links schematisch dargestellt die sechs transmembranären Helices (S1-S6) mit intrazellulärem (In) N- und C-Terminus einer α -Untereinheit. Die positiv geladene (+) S4 Schleife ist Teil des Spannungssensors (*voltage sensor*). Zwischen S5 und S6 befindet sich die porenbildende Region (P). Vier dieser α -Untereinheiten können den rechts dargestellten funktionsfähigen Kanal bilden. Die Tetramerisierung (T1) wird über den N-Terminus vermittelt. Die Anlagerung eines modifizierenden β -Proteins (*β -tetramer*) erfolgt ebenfalls N-terminal. (Quelle: Yellen, 2002)

Wie in Abbildung 1.3 dargestellt, umschließen die vier α -Proteine eine zentrale wassergefüllte Pore, die von S5, S6 und deren Verbindungsstück P begrenzt wird und die eigentliche Schleuse für Ionen darstellt. Für den Mechanismus der spezifischen Selektion von Kaliumionen entstand Ende der 90er Jahre ein recht genaues Bild. Auf der intrazellulären Membranseite befindet sich ein weiter Eingang zu einem großen mit Wasser gefülltem Raum, der als Elektrolytspeicher für die zu leitenden Ionen dient. Aufgrund seiner Ausmaße sind bereits zwei Drittel der Membrandicke überbrückt bevor die Ionen den sehr schmalen inneren Porenmund erreichen, an dem die Selektion der Kaliumionen stattfindet. In der Nähe dieses intrazellulären Kanalmundes befinden sich dafür negativ geladene α -Helices, die zunächst alle Kationen wie

Na^+ , K^+ oder Ca^{2+} stabilisieren (Doyle et al., 1998; Roux et al., 1999). Den angrenzenden Selektivitätsfilter können aber nur Ionen ohne Hydrathülle passieren. Die Carbonylgruppen der benachbarten, hochkonservierten Aminosäuresequenz GYG schaffen daher Raum- und Ladungsverhältnisse, die den Aufbau der Hydrathülle um ein Kaliumion imitieren (Armstrong, 1975). Die koordinativen Bindungen zwischen Ion und Sauerstoffresten können so die Wassermoleküle ersetzen und die energieaufwändige Dehydratisierung der Kaliumionen wesentlich erleichtern. Auf diese Weise erfolgt die Selektion von Kalium. Andere Kationen wie Natriumionen werden energetisch weniger günstig komplexiert und dehydratisiert. Die Permeabilität für Natrium ist daher um den Faktor 10^4 geringer als bei Kaliumionen (Doyle et al., 1998; Morais-Cabrel et al., 2001).

Der geringe Abstand von nur 0,7 nm, mit dem die einzelnen Ladungsträger aufeinander folgen, verhindert eine stabile Bindung zwischen dem Kaliumion und den Sauerstoffatomen der Carbonylgruppen und erreicht eine sehr kurze Verweildauer der Ionen im Filterbereich (Morais-Cabrel et al., 2001). Im Bereich direkt hinter dem äußeren Porenmund sorgen außerdem die großen extrazellulären Wassermengen für eine schnelle Entsorgung der gefilterten Ionen. Die Geschwindigkeit, mit der Kalium durch den Kanal geschleust wird, kann deshalb Werte erreichen, wie man sie bei reiner Diffusion in Wasser erwarten würde.

Der funktionell nachgewiesene Spannungssensor wurde als positiv geladene Sequenzen auf den transmembranären S4-Helices identifiziert (Seoh et al., 1996; Aggarwal et al., 1996). Als Ladungsträger dienen dabei die positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin, die hier jede dritte Position besetzen. Änderungen des transmembranären Potentials verschieben diese Ladungen zwischen Extra- und Intrazellulärraum. Man vermutet, dass der dabei beobachtete relativ geringe Bewegungsaufwand durch eine schraubenförmige Drehung des S4-Segmentes möglich wird (Guy et al., 1986). Im Gegensatz dazu geht ein weiteres, seit kurzem diskutiertes Modell von hochmobilen S3-S4-Paddeln aus, die über relativ ausgeprägte Bewegungen von bis zu 2 nm die Änderungen des Membranpotentials über die S4-S5-Verbindung mechanisch an die Kanalpore vermitteln (Jiang et al., 2003; Ruta et al., 2005). Das

Kanalprotein könnte auf diese Weise Spannungsänderungen detektieren und gegebenenfalls aktivieren. Dieser Vorgang erfordert jedoch einen relativ hohen Energieaufwand. Kritikern erscheint der beschriebene Mechanismus daher energetisch unrentabel (*Bezanilla, 2005*). Die genaue Arbeitsweise des Spannungssensors ist aus diesem Grund Gegenstand kontroverser Diskussionen und bedarf noch weiterer, klärender Untersuchungen.

Bei der Inaktivierung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle werden drei unterschiedliche Mechanismen diskutiert. Die erste und schnellste Form wird als N-Typ-Inaktivierung, Kugel-Kette-Mechanismus oder A-Typ-Kanal bezeichnet und benötigt anscheinend eine kurzzeitige Öffnung des Kanals, da ihr immer eine transiente Aktivierung vorausgeht. Untersuchungen mit gentechnisch veränderten Ionenkanälen zeigten, dass der N-Terminus hierbei eine entscheidende Rolle spielen muss (*Hoshi et al., 1990; Zagotta et al., 1990*). Entfernte man bei Proteinen, die mit diesem Mechanismus arbeiten, das Aminoende, so war keine Inaktivierung mehr möglich. Wurden jedoch Kanäle künstlich mit diesem N-Terminus versehen, zeigten sie die oben beschriebene Inaktivierungskinetik. Anscheinend ist hierfür ein kugelförmiges Protein verantwortlich, das über eine Aminosäurekette mit dem N-Terminus verbunden ist. Es kann an die S6-Segmente der inneren Porenöffnung binden, die Pore verschließen und so zu einer sehr schnellen Inaktivierung des Kanals führen (*Holmgren et al., 1997; Isacoff et al., 1991*).

Der zweite Mechanismus verläuft wesentlich langsamer. Kanäle mit diesem Inaktivierungsverhalten nennt man daher auch verzögerte Gleichrichter. Da diese Inaktivierungsform auch nach Entfernung des Kugelproteins am N-Terminus zu beobachten war, erhielt sie die Bezeichnung C-Typ-Inaktivierung (*Hoshi et al., 1991*). Versuche mit Substanzen, die von außen auf die Zelle gegeben wurden, deuteten auf einen extrazellulären Vorgang hin (*Lopez-Barneo et al., 1993*). So konnte die C-Typ-Inaktivierung mit extrazellulärem Tetraethylammonium verhindert oder der einmal geschlossene Kanal mit der extrazellulären Applikation von Metallionen im inaktivierten Zustand stabilisiert werden (*Choi et al., 1991; Yellen et al., 1994*). Der große Einfluss der extrazellulären Kaliumkonzentration auf die C-Typ-Inaktivierung legte dann die Beteiligung des Selektivitätsfilters nahe. Dieser zeigt bei niedrigen

Kaliumkonzentrationen strukturelle Veränderungen, die den Kanaldurchgang behindern (*Baukrowitz et al.*, 1995). Die C-Typ-Inaktivierung könnte den physiologischen Regulationsmechanismus bei repetitiven elektrischen Signalen darstellen.

Bei der dritten Form der Inaktivierung sind die vier S6-Segmente beteiligt. Vergleichende Röntgenstrukturanalysen von offenen und geschlossenen Kanälen zeigten, dass diese Proteinstränge den Kanal unterhalb der Kavität verschließen können. Durch eine Drehung der Moleküle gegeneinander, kreuzen sich die vier Segmente und behindern so den Ionenfluss (*Yellen*, 2002).

Unabhängig vom exakten Aufbau und zugrunde liegendem molekularen Mechanismus kann die allgemeine Funktionsweise eines Ionenkanals an einem stark vereinfachten Modell verdeutlicht werden, das von drei unterschiedlichen Konformationszuständen ausgeht: 1.) geschlossen und aktivierbar (C wie *closed*), 2.) geöffnet und leitend (O wie *open*) sowie 3.) inaktiviert, weder leitend noch aktivierbar (I wie *inactivated*). Die Aktivierung aus dem geschlossenen, aktivierbaren C-Kanalzustand erfolgt auf das entsprechende Signal hin, das im Falle der spannungsabhängigen Kanäle aus einer Depolarisierung der Membran besteht. Das Kanalprotein öffnet und leitet Ionen (O). Um es wieder zu verschließen, stehen dann zwei Möglichkeiten zur Verfügung: durch Deaktivierung kehrt das Kanalprotein direkt in seinen Ausgangszustand zurück, ist wieder geschlossen aber aktivierbar (C). Durch Inaktivierung wird jedoch die geschlossene und nicht aktivierbare I-Konformation eingenommen. Der Kanal muss sich dann erst vom I-Zustand erholen und zum C-Zustand regenerieren bevor er über das spezifische Öffnungssignal wieder aktiviert werden kann. C-, O- und I-Zustand befinden sich dabei nach dem Massenwirkungsgesetz in einem fließenden Gleichgewicht. Das einzelne Kanalprotein kann zwar mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zwischen den einzelnen Möglichkeiten wechseln, in der Gesamtheit der zahlreichen Kanäle einer Membran entwickelt sich daraus aber eine Balance zwischen geschlossenen, aktivierten und inaktivierten Kanalfraktionen. Durch das entsprechende kanalspezifische Signal kann diese Balance in eine beliebige Richtung verschoben und so die Kanalaktivität und -verfügbarkeit gesteuert

werden. Im Falle der spannungsabhängigen Kanäle bedeutet dies, dass Höhe und Änderungen des Membranpotentials über die Anzahl der C-, O- und I-Konformitäten und damit über den resultierenden Kaliumstromfluss entscheiden.

2.3 Die hKv2-Familie

Die hKv2-Familie besteht aus zwei Mitgliedern: hKv2.1 und hKv2.2. Bei sämtlichen elektrophysiologischen Untersuchungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, waren Kanalproteine des humanen spannungsabhängigen Kaliumkanals beteiligt, der laut *International Union of Pharmacology* als hKv2.1 bezeichnet wird. Aufgrund der Homologie zu Gensequenzen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wird er der Gruppe der *Shab*-Kanäle zugeordnet und wird nach der *Human-Genom-Organisation*-Klassifikation auch hDRK1 genannt. Die kodierenden Gene befinden sich auf dem langen Arm des Chromosoms 20. Nach oben beschriebener Anordnung bilden vier α -Untereinheiten einen homotetrameren Kanal aus insgesamt 858 Aminosäuren, der hochselektiv Kaliumionen transportieren kann. Erst in Abwesenheit von Kalium können auch Natriumionen befördert werden. Beim Inaktivierungsverhalten zeigt hKv2.1 eine Kinetik vom C-Typ. Vor allem Membranen von erregbaren Zellen wie Neuronen oder Myozyten sind mit hKv2.1-Kanälen ausgestattet. So finden sich hKv2.1-Proteine in hoher Dichte in unterschiedlichen Anteilen des Gehirns, wie Kortex, Hippocampus oder Cerebellum sowie in Herz- und Skelettmuskulatur. In Retina, Cochlea, Lunge und Pulmonalarterien sind hKv2.1-Kanäle ebenfalls repräsentiert. Die Ionenkanäle bestimmen hier die Form und Dauer der Repolarisation beispielsweise beim Aktionspotential und beeinflussen über Modulation des Membranpotentials und der Refraktärzeit die elektrische Erregbarkeit der Zellen. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch Heteromultimerisierung mit γ -Untereinheiten eine Modifizierung des elektrophysiologischen Verhaltens möglich ist (Gutman, 2005).

Das Gen des hKv2.2 befindet sich auf Chromosom 5q11 und kodiert für ein Kanalprotein aus 911 Aminosäuren. Er zählt ebenfalls zur *Shab*-Familie und

wird alternativ auch als *CDRK* bezeichnet. Die Aufgaben des arbeitenden Proteins sind im Prinzip identisch zum *hKv2.1*, wobei *hKv2.2* eine unterschiedliche Organverteilung aufweist. Man findet ihn hauptsächlich im olfaktorischen System, im Cortex, Hippocampus und Cerebellum, sowie im Ventrikelmyokard, in der Zunge, im sympathischen Nervensystem und in der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes und der Mesenterialarterien. (Gutman, 2005). Die Aminosäuresequenzen sind aus Abbildung 1.4 zu entnehmen.

2.4 Die hKv6-Familie

Die *hKv6.1*-, *hKv6.2*-, *hKv6.3*-, und *hKv6.4*-Proteine sind γ -Untereinheiten, das heißt sie sind nicht in der Lage als Homotetramere funktionsfähige Ionenkanäle zu bilden. Sie fungieren durch Heterotetramerisierung als Modifizierer der *Kv2*-Familie. Das Gen für *hKv6.1* befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 20. Man findet *hKv6.1*-Proteine v.a. im Skelettmuskel und Gehirn, sowie im Uterus, in den Ovarien, in den Nieren, im Pankreas, in der Plazenta und in der Prostata. Das Kanalprotein des *hKv6.2* wird durch ein Gen des Chromosoms 2 kodiert, besteht aus 436 Aminosäuren und wird vor allem im Myokard, im fetalen Hirn und in B-Zellen exprimiert. Die kodierenden Sequenzen für *hKv6.3* findet man auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2, die Proteine im gesamten Gehirn und Rückenmark, sowie im Hoden, Thymus und Nebenniere. Chromosom 16 enthält die Erbsubstanz für das *hKv6.4*-Molekül, welches man v.a. in Gehirn, Leber und Kolon nachweisen kann (Gutman, 2005). Mutationen in den Gensequenzen für *hKv6.2*, *hKv6.3* und *hKv6.4* zeichnen für bekannte hereditäre Erkrankungen wie die benigne Epilepsie des Neugeborenen oder die nicht syndromale sensorineurale Taubheit verantwortlich (Borgatti et al., 2004; Kubisch et al., 1999). Die Aminosäuresequenzen sind aus Abbildung 1.4 zu entnehmen.

Kv2.1	MPAGMTKHGSRSTSSLPPEP.MEIV	24
Kv2.2	MAEKAPPGLNRKTSRSTLSLPPEP.VDII	28
Kv6.1	MTLLPGDNSDYDYSALSCTSDASFHPAFLPQRQ.AIKGAFYRRAQRLRPQDEPRQGC	56
Kv6.2	MEPWPCSPGG.....	10
Kv6.3	MT	2
Kv6.4	MPMPSRDGGLHPRHHHYGSHSPWSQLLSSPMETPSIKGLYRRVRKVGALDA.....	52
Kv2.1	RSKACSRRVRLNVGGLAHEVLWRTLDRLPRTLGLKLRDCNTHDSLLEVCDDYSLDDN	81
Kv2.2	RSKTCSRRVKINVGGLNHEVLWRTLDRLPRTLGLKLRDCNTHESLLEVCDDYNLNE	85
Kv6.1	QPEDRRRRIIINVGGIKYSLPWTTLDEFPLTRLGQLKACTNFDDILNVCCDDYDVTCS	113
Kv6.2	GGGTRARHVIINVGGCRVRLAWAALARCPALARLERLRACRGHDDLRLVCDDYDVSRD	67
Kv6.3	FGRSGAASVVLNVGGARYSLRELLKDFPLRRVSRLHGCRSERDVLEVCDDYDRERN	59
Kv6.4	SPVDLKKKELILNVGGRRYLLPWSTLDRFPLSRLSKLRLCRSYEEIVQLCDDYDEDSQ	109
Kv2.1	EYFFDRHPGAFTSILNFYR.TGRLHMMEEMCALSFQELDYWGIDEIYLES CC QARY	137
Kv2.2	EYFFDRHPGAFTSILNFYR.TGKLMMEEMCALSFQELDYWGIDEIYLES CC QARY	141
Kv6.1	EFFFDNRNPGAFGTILTFLR.AGKLRLLRREMCALSFQELLYWGIAEDHLDG CC KRRY	169
Kv6.2	EFFFDNRSPCAFRAIVALLR.AGKLRLLRGPCALAFRDELAYWGIDEARLER CC LRRL	123
Kv6.3	EYFFDRHSEAFGFILLYVRGHGKLRFAPRMC EL SFYNEMIIYWGLEGAHLEY CC ORRL	116
Kv6.4	EFFFDNRSPSAFGVIVSFLA.AGKLVLLQEMCALSFQELAYWGIEEAHLER CC LRKL	165
Kv2.1	HQKKEQMNEELKREAETLRERE.....GEEFDNTCCAERKKLWDLLEKPNSSVAA..188	
Kv2.2	HQKKEQMNEELRREAETMRDGE.....GEEFDNTCCPKRKKLWDLLEKPNSSVAA..192	
Kv6.1	LQKIEEFAEMVEREEEDDLDSEGRDSEGPAEGEGRGRCMRRLRDMVERPHSGLPG..226	
Kv6.2	RRREEEAARAGPTERGAQGS....PARALGPRGRLQGRRRRLRDVVDNPHSGLAG..176	
Kv6.3	DDRMSDTYTFYSADEPGVLRDE...ARPGGAEAAPSRRWLERMRRTFEEPTSSLAA..170	
Kv6.4	LRKLEELEELAKLHREDVLRQQR..ETRRPASHSSRWGLCMNRLREMVENPQSGLPG..220	

Abb. 1.4: Aminosäuresequenzen der einzelnen hKv-Kanäle. Die T1-Domänen sind mit fetten Buchstaben gekennzeichnet. Das HX₅CX₂₀CC-Motiv wird mit jeweils schwarzen Boxen hervorgehoben. (Quelle: Mederos *et al.*, 2008).

3. Abriss über die Historie der Patch-Clamp-Technik

Die *Patch-Clamp*-Technik gehört heute zu den wichtigsten elektrophysiologischen Untersuchungsmethoden. Sie wurde von *Erwin Neher* und *Bert Sakmann* in den siebziger Jahren entwickelt und ermöglicht es, Ionenströme durch Zellmembranen mit hoher Auflösung zu messen. Im Jahre 1991 erhielten die beiden Wissenschaftler für ihre Arbeit zu diesem Thema den Nobelpreis für Medizin und Physiologie.

Die Technik geht zurück auf die Spannungsklemme von *Curtis* und *Cole*. Mit deren Hilfe werden der Zellmembran definierte Potentiale aufgezwungen und der resultierende Strom gemessen. Über einen Rückkopplungsverstärker wird die Ist-Spannung der Membran mit der vorgegebenen Soll-Spannung verglichen. Das Membranpotential wird konstant gehalten, indem eine Elektrode im Ausgleich soviel Strom in die Zelle injiziert wie über die Membran abfließt. Somit ist der Klemmstrom ein Maß für die transmembranären Ströme.

Hodgkin und *Huxley* gelang es 1952 erstmals mittels intrazellulärer Mikroelektroden ein Aktionspotential abzuleiten. Durch ihre Arbeiten am Riesenaxon des Tintenfisches konnten sie zeigen, dass der Gesamtstrom des Aktionspotentials aus zwei eindeutig voneinander getrennten Ionenströmen besteht (*Hodgkin & Huxley*, 1952). Sie bewiesen damit die Existenz selektiver, von der Zelle unterschiedlich gesteuerter Ionenkanäle.

Der große Fortschritt der *Patch-Clamp*-Technik bestand in einer dramatischen Steigerung der Empfindlichkeit der Messungen. *Neher* und *Sakmann* (1976) konnten das starke Hintergrundrauschen, welches die Experimente bis dahin begleitet hatte, soweit reduzieren, dass Stromableitungen durch einzelne Ionenkanäle möglich wurden. Sie isolierten Membranflecken, sogenannte *Patches*, durch vorsichtiges Aufsetzen feiner Glaskapillaren auf die Zellen und stellten fest, dass durch anschließendes Ansaugen der Zellmembran Abdichtwiderstände im Gigaohmbereich möglich waren (*giga-seal*). Dieser sogenannte *cell-attached*-Zustand zeichnet sich neben der Erzeugung einer elektrischen Abgrenzung auch durch eine relativ hohe mechanische Stabilität aus. Ausgehend von dieser Konfiguration werden

die in Abbildung 1.5 dargestellten Messkonfigurationen der *Patch-Clamp*-Technik erreicht (*Hamill et al.*, 1981).

Die am häufigsten verwendete Messart ist der Ganzzellmodus. Dieser liegt auch den Experimenten dieser Arbeit zugrunde. Durch kurzes Saugen wird der Membranfleck unterhalb der Pipettenöffnung aufgebrochen, wodurch alle Kanäle der Zellmembran einer Untersuchung zugänglich gemacht werden. Das Abziehen der Pipette ausgehend von der *cell-attached*- beziehungsweise von der *whole-cell*-Konfiguration führt zum Herauslösen des Membranflecks. Dieses Vorgehen ermöglicht Einzelkanalableitungen, wobei wahlweise die Innenseite (*inside-out*) oder Außenseite (*outside-out*) der Membran für einen Lösungswechsel zur Verfügung steht.

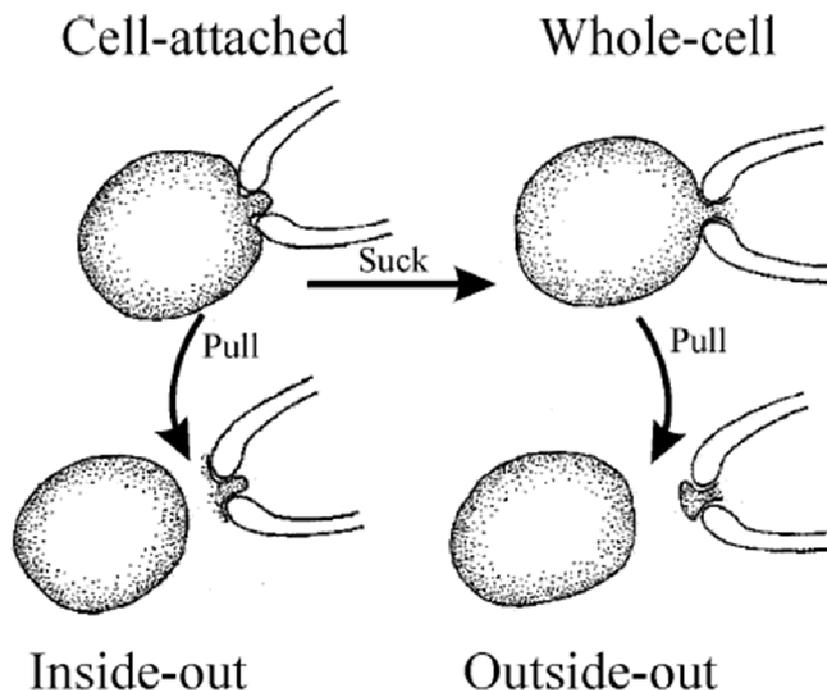


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der möglichen *Patch-Clamp*-Messarten. Die *cell-attached*-Konformation ist gut für Einzelkanalmessungen geeignet und stellt die Ausgangsposition dar. Durch Saugen (*Suck*) wird der Ganzzell- oder *whole-cell*-Modus erreicht, bei dem alle Kanäle der Zelle für Messungen zur Verfügung stehen. Wird nun die Pipette von der Zelle weg gezogen (*Pull*) entsteht die *outside-out*-Methode für Einzelkanaluntersuchungen. Im Gegensatz hierzu kann bei *inside-out*-Messungen das intrazelluläre Milieu durch wechselnde Badlösungen verändert werden. (Quelle: *Farokhi*, 2002)

Material und Methoden

Dieses Kapitel führt die verwendeten Materialien auf, enthält den Aufbau der Versuchsanordnungen und beschreibt die Vorgehensweise bei den elektrophysiologischen Experimenten.

Die in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden mit Expressionsvektoren, die cDNA verschiedener Kanäle beinhalten, transfiziert. Die transfizierte Säugetierzelle transkribierte und translatierte die Kanal-cDNA zu Kanalproteinen, die assemblierten und zur Zellmembran transportiert wurden um dort als funktionelle Kanalkomplexe zu inserieren. Anschließend konnte mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik die Stromantwort auf die angelegte, definierte Transmembranspannung beobachtet werden. Der gemessene Stromverlauf deckte das Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten auf und erlaubte eine Charakterisierung der untersuchten Kaliumkanäle.

1. Zellkultur

Ionenkanäle, die elektrophysiologisch charakterisiert werden sollen, untersucht man am besten als Membranbestandteile von Zellen. Diese konnten entweder aus transfizierten Zelllinien hervorgehen oder aus Geweben isoliert werden, bei denen eine physiologische Ausstattung mit diesen Proteinen nachgewiesen wurde. In diesem Fall wurde eine transiente Methode gewählt und die *CHO-K1*-Zelllinie des chinesischen Hamsterovars als geeignet befunden, da sie wenig endogen produzierte Kaliumkanäle aufweisen, sie kaum interzelluläre Verbindungen ausbilden und eine heterologe Transfektion einfach durchzuführen ist. Im Folgenden wird die Pflege, Anzucht und Kultur dieser Zellen beschrieben.

Die *CHO-K1*-Zelllinie wurde im Brutschrank (*HERAcell*, *Kendro Laboratory Products GmbH*, Hanau, Deutschland) bei 37°C und fünfprozentiger

CO₂-Konzentration in 250 ml Flaschen (*Sarstedt*, Nürnberg, Deutschland) mit *HAMs-F12* Medium (*PAA Laboratories GmbH*, Linz, Österreich) als *Monolayer* kultiviert. Zur Förderung eines schnellen Wachstums wurde das Nährmedium mit 10 Prozent *Fetal Calf Serum* (*PAA Laboratories GmbH*, Linz, Österreich) und zum Schutz vor Keimen mit je 50 units/ml der beiden Antibiotika Penicillin und Streptomycin versetzt. Bei ausreichend dichter Besiedelung einer Kulturflasche (circa 80 Prozent des Bodens sind bedeckt) wurden die Zellen mit Hilfe von 2 ml 0,05 prozentigem Trypsin (*PAA Laboratories GmbH*, Linz, Österreich) mit 0,02 prozentigem EDTA-Zusatz vereinzelt und vom Boden abgelöst. Das die Trypsinwirkung störende Kalzium wurde zuvor durch eine Spülung mit *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (*PAA Laboratories GmbH*, Linz, Österreich) entfernt. Um die Proteolyse anschließend wieder zu beenden, wurde das Trypsin mit 10 ml *HAMs-F12* Medium bis zur Wirkungslosigkeit verdünnt. Die Zellen wurden dann 1 Minute bei 1000 Umdrehungen in einem Rührchen abzentrifugiert (*Labofuge 400* von *Heraeus*, Hanau, Deutschland) und in frisches Medium überführt. Aus dieser Lösung konnten dann neue Kulturflaschen mit Verdünnungen von 1:10, 1:20 und 1:30 hergestellt und Kulturschälchen (Durchmesser 35 mm, *Nunc Brand Products, Nalge Nunc International*, Dänemark) mit ca. 200.000 Zellen für Transfektion und Messung vorbereitet werden. Dazu bestimmte man mit der Neubauerzählkammer die Zelldichte und überführte das benötigte Volumen in Flaschen oder Schälchen mit warmem *HAMs-F12*-Medium.

2. Transfektion

Die 35mm-Schälchen mit jeweils ca. 200.000 Zellen wurden für 24 Stunden im Brutschrank aufbewahrt und anschließend transfiziert. Man versteht darunter die Impfung der Zellen mit fremder cDNA, aus der Proteine gebildet werden sollen. In diesem Fall standen Gensequenzen des *hKv2.1*-Kanals, von *hKv6.1*, *hKv6.3* und *hKv6.4* sowie von der Mutationsvariante *hKv2.1H105V* zur Verfügung, die in die Expressionsvektoren *pcDNA3.1(+)* (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) oder *pIRES* (*Clontech*) integriert wurden. In den *IRES*-Konstrukten

aus *hKv6.1*, *hKv6.3* oder *hKv6.4* mit *hKv2.1* fand die Transkription der verschiedenen Gensequenzen zwar über den gleichen Promoter statt, die Translationsrate war beim Expressionsvektor *pIRES* jedoch für eine der beiden Gensequenzen zehnmal höher als für die zweite, sodass die *hKv6*-Proteine mit einer zehnfach höheren Konzentration exprimiert werden konnten als die *hKv2.1*-Untereinheiten. Dies sicherte zum einen, dass immer beide Untereinheiten gleichzeitig vorlagen und minimierte gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit der Bildung eines homotetrameren Ionenkanals aus vier *hKv2.1*-Proteinen. Das verwendete Transfektionsmedium *Fugene 6* (Roche, Indianapolis, USA) versprach höhere Transfektionsraten als andere Medien wie *Lipofectin* oder *Metafectene*. Jedem Schälchen wurde 1 µg pcDNA des entsprechenden Kaliumkanals zusammen mit 0,1 µg pcDNA des grün fluoreszierenden Proteins *EGFP* (*Enhanced Green Fluorescens Protein*, Invitrogen, San Diego, USA) angeboten. Dadurch konnten bei den Messungen die erfolgreich transfizierten Zellen auffindig gemacht werden. In blauem Licht fluoreszierten diese grün, während Zellen, die keine DNA aufgenommen oder umgesetzt hatten auch keine grüne Fluoreszenz zeigten. Das Verhältnis von DNA-Menge (µg) und *Fugene 6* (µl) betrug dabei 1(µg): 3(µl). Ein typischer Transfektionsansatz war beispielsweise:

1 µg *hKv2.1* + 0,1 µg *EGFP* + 3,3 µl *Fugene 6*.

Das Transfektionsreagenz *Fugene 6* wurde in 100 µl serumfreien *HAM's-F12*-Medium in Lösung gebracht und anschließend mit der pcDNA vermischt. Nach 20 Minuten konnte der *Fugene*-pcDNA-Komplex auf die Zellen gegeben werden. Es stellte sich heraus, dass nach einer Transfektionsdauer von 10 bis 24 Stunden ausreichend Kanalproteine produziert waren und Messungen abgeleitet werden konnten.

3. Elektrophysiologie

Für die Untersuchung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle wurde mit der in der Einleitung erläuterten *Patch-Clamp*-Technik (Hamill et al., 1981) in der Ganzzellkonfiguration gearbeitet. Der Aufbau und die verschiedenen Komponenten werden nun beschrieben und sind in Abbildung 2.1, 2.2 und 2.3 dargestellt. Die Messvorrichtung befand sich auf einem aktiv schwingungsgedämpften Tisch (*Kinetic Systems Inc.*, Roslindale, USA) und war von einem Metallkäfig (Eigenbau, Feinmechanikwerkstatt, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg) umgeben, um Störeinflüsse der Umgebung, wie mechanische Vibrationen oder elektromagnetische Strahlung abzuschirmen. Sämtliche Versuche wurden bei Raumtemperaturen zwischen 23 und 27°C mit Hilfe des inversen Mikroskops *IX 70* von *Olympus* (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden die Messungen mit dem *Pulse*-Programm (*Pulse v8.63*, *HEKA Electronics*, *Dr. Schulz GmbH*, Lambrecht, Deutschland) vom Computer aus gesteuert, welcher auch die vom Verstärker aufgenommenen Daten speicherte. Zunächst wurde der Verstärker *EPC 9* (*Version D ITC 16*, *HEKA*, Lambrecht, Deutschland), später auch der *EPC 10* (*Version E LIH 1600*, *HEKA*, Lambrecht, Deutschland) verwendet, die jeweils über einen integrierten Besselfilter verfügen. Als unabhängiges Kontrollinstrument war über den elektronischen Tiefpass-Besselfilter *LPBF-48DG* (*NPI electronic GmbH*, Tamm, Deutschland) zusätzlich ein Oszilloskop (*TDS 2002* von *Tektronix Inc.*, Beaverton, USA) angeschlossen. Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms *Origin 7.0* analysiert.

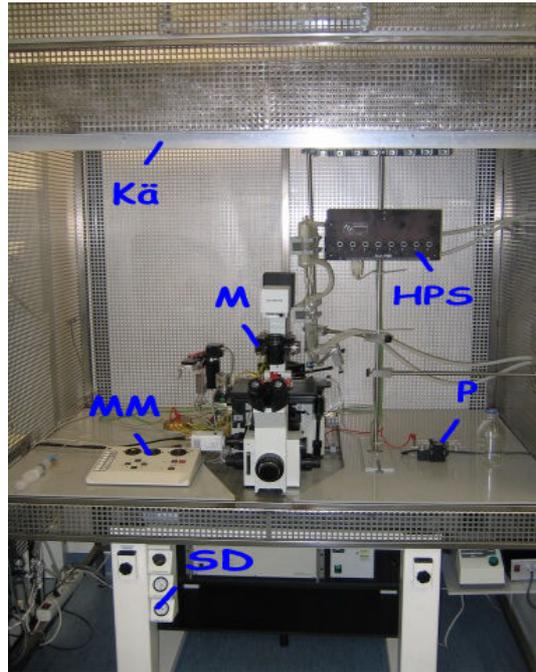


Abb. 2.1: Der Messstand. Der Messtisch stand auf schwingungsgedämpften Stützen (SD) und war von einem Faradayschen Käfig (Kä) umgeben. Oberhalb des inversen Mikroskops (M) befand sich die Halterung für das Perfusionssystem (HPS). Rechts war die Pumpe (P) für die Absaugung und links das Steuerpult für den Mikromanipulator (MM).

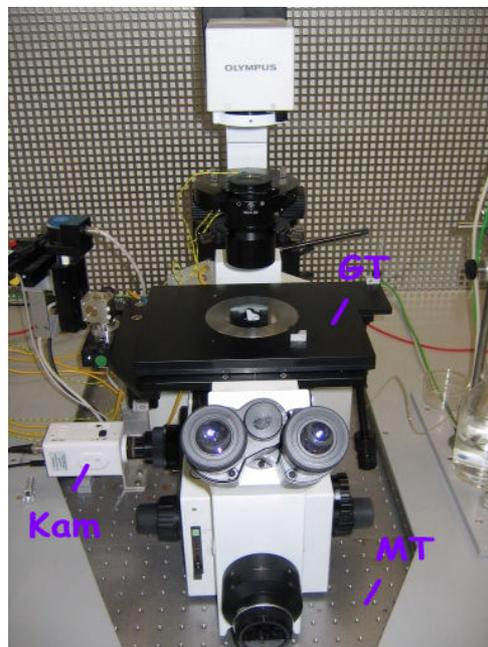


Abb. 2.2: Das Mikroskop. Das inverse Mikroskop war auf dem schwingungsgedämpften Messtisch (MT) befestigt. Es war mit einem Gleittisch (GT) ausgestattet, mit dessen Hilfe die Zellen in die Messposition gebracht werden konnten. Die Kamera (Kam) war an einen Schwarz-Weiß-Monitor angeschlossen, mit dem die Zellen beurteilt und überwacht werden konnten.

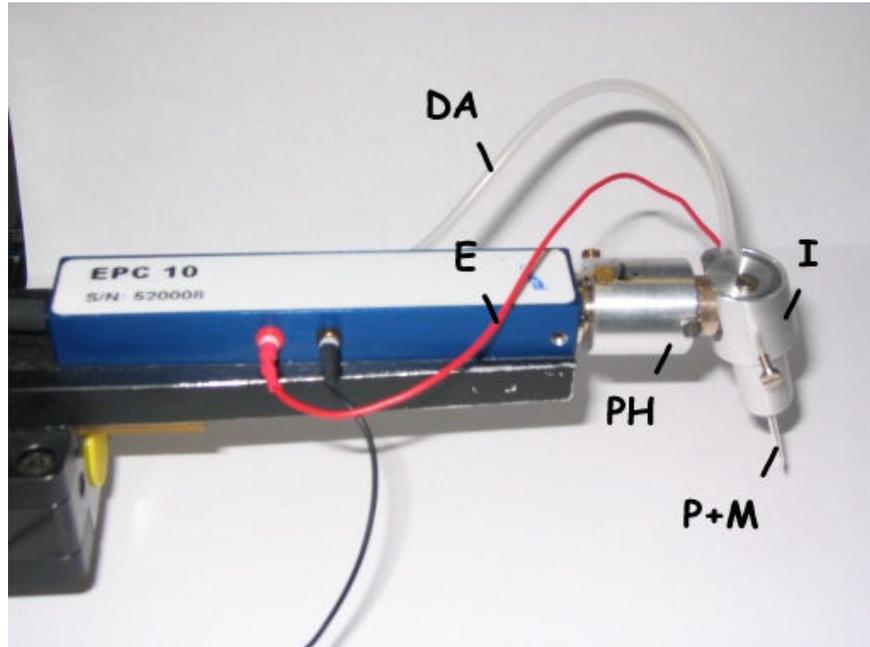


Abb. 2.3: Der EPC 10 Vorverstärker. Der Vorverstärker war über den Pipettenhalter (PH) an die Messelektrode angeschlossen. Diese befand sich in der Patchpipette (P+M) und wurde durch eine geerdete (E) Isolierung (I) von elektrischen Störeinflüssen abgeschirmt. Über den Druckapplikator (DA) konnte an der Pipette und damit auch an der Zelle Über- oder Unterdruck angelegt werden.

4. Messkammer

Die verwendete Messkammer ist in Abbildung 2.4 gezeigt und wurde in der Werkstatt des Instituts aus Plexiglas hergestellt. Dabei wurde eine an die Kulturschälchen (35 mm Durchmesser, *Nunc Brand Products, Nalge Nunc International*, Dänemark) angepasste Form gewählt, durch die eine Fixierung am Rand des Schälchens ermöglicht wurde. Vier Magnetclips gaben der Kammer zusätzlichen Halt. Am Rand waren für Perfusionsschlauch und Referenzelektrode zwei vertikale Bohrungen vorhanden. Von hier gelangte die Badlösung in den zentral gelegenen Kanal (Länge x Breite x Höhe: 20 x 4 x 1,5 mm), in dem sich die zu messenden Zellen befanden. Diesen Bereich passierte die Flüssigkeit mit annähernd laminarer Strömung, bevor sie über das offene Ende des Kanals den äußeren Anteil des Schälchens mit der Absaugvorrichtung erreichte.

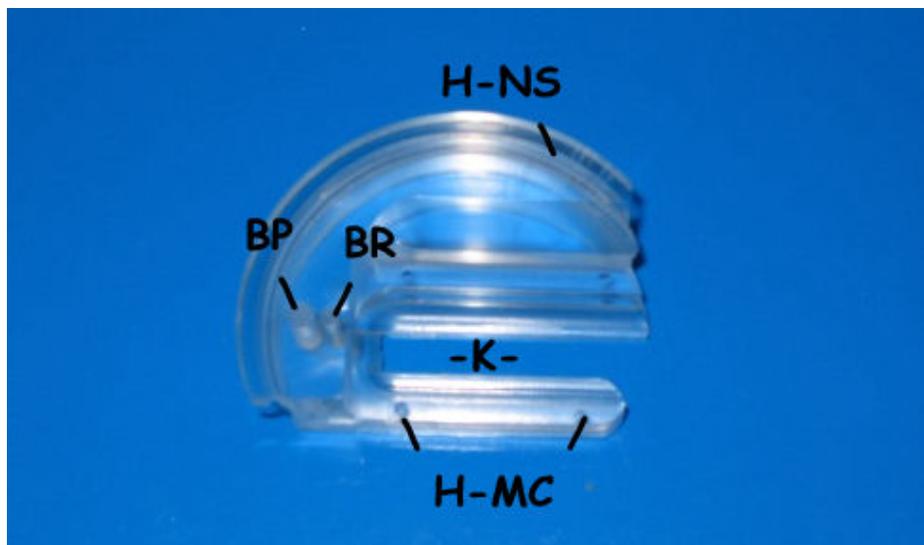


Abb. 2.4: Die Messkammer. Die Messkammer war in ihren Abmessungen dem Kulturschälchen angepasst und besaß einen ausgezogenen Rand, der sich über den Rand des Kulturschälchens stülpte und als Halterung (H-NS) diente. Vier Magnetclips gaben der Kammer an den entsprechenden Vertiefungen (H-MC) zusätzlichen Halt. Die Badlösung erreichte über die vertikale Bohrung für den Perfusionsschlauch (BP) den Kanal (K). Die Bohrung für die Referenzelektrode (BR) ermöglichte das Eintauchen der Elektrode in die Badlösung.

5. Perfusionssystem

Die Badlösungen wurden in 50 ml Perfusorspritzen gefüllt und circa 30 cm über dem Niveau der Messkammer an der Halterung angebracht. Von hier gelangten die Flüssigkeiten über Silikonschläuche (*Tygon*) mit 1,6 mm innerem Durchmesser zum gemeinsamen Endstück. Die Abmessungen dieses PVC-Schlauches (*Reichelt*, Sande, Deutschland) bestimmten maßgeblich die Flussgeschwindigkeit der Lösungen. Mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Länge von 14 cm wurde eine Perfusionsrate von 1015 μl pro Minute hergestellt. Über die dafür vorgesehene Bohrung in der Messkammer erreichten die Salzlösungen schließlich das Kulturschälchen mit den Zellen. Der Aufbau der Messkammer ermöglichte eine annähernd laminäre Strömung. Abbildung 2.5 zeigt die Anordnung eines Kulturschälchens mit Messkammer und angeschlossenem Perfusionssystem.

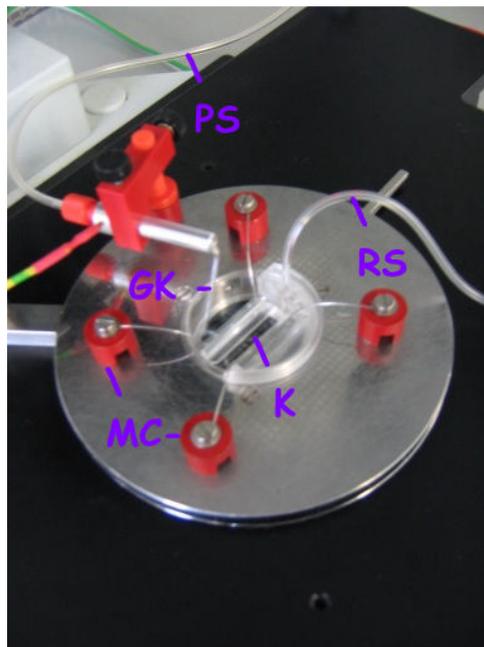


Abb. 2.5: Perfusion und Absaugung. Das Perfusionssystem versorgte das Reduzierstück (RS) mit Badlösung. Über eine Bohrung in der Messkammer erreichte die Lösung den Kanal (K) und passierte ihn mit annähernd laminärer Strömung. In diesem Bereich befanden sich am Boden des Kulturschälchens die zu messenden Zellen. Die Kammer wurde durch vier Magnetclips (MC) in Position gehalten. Eine gewinkelte Glaskapillare (GK), an die der Pumpenschlauch (PS) angeschlossen war, entfernte die Badlösung wieder aus dem Schälchen. Die Absaugvorrichtung sowie die Halterung für Kulturschälchen und Magnetclips waren geerdet.

Zum Absaugen kam eine rechtwinklig gebogene Glaskapillare (*GB 150TF-8P*, *Science Products GmbH*, Hofheim, Deutschland) zum Einsatz, an die eine Peristaltikpumpe (12 V, Eigenbau, Feinmechanikwerkstatt, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg) angeschlossen war. Es wurde darauf geachtet, dass die Lösung in kleinen Portionen mit dazwischen liegenden Luftbläschen entfernt wurde und im Absaugschlauch kein durchgehender Flüssigkeitsfaden entstehen konnte, der als Antenne hätte wirken können.

6. Referenzelektrode

Bei der Herstellung der Referenzelektrode (siehe Abbildung 2.6) wurde zunächst eine passende Isolierungshülle über einen teilweise mit Silberchlorid beschichteten Silberdraht (*EP05*, *WPI*, *Sarasota*, *USA*) mit 0,5 mm Durchmesser gestülpt. Das beschichtete Ende ragte dabei noch ca. 1,5 cm aus der Hülle heraus und wurde an der Übergangsstelle mit Isolierlack besprüht. Am gegenüberliegenden Ende wurde mit Hilfe der Microprozessor gesteuerten Lötstation *LS 50* von *Voltcraft* ein vergoldeter Adaptorstift befestigt, über den die Elektrode an die Messkette angeschlossen werden konnte. Diese Übergangsstelle wurde mit einem kleinen Stück Schrumpfschlauch gesichert.

Für die regelmäßige Erneuerung der Silberchloridbeschichtung wurde der Silberdraht zunächst mit feinem Sandpapier gereinigt, dann mit der Anode einer Gleichstromquelle verbunden und in eine 150 mM Kaliumchloridlösung getaucht. Ein weiterer 4 cm langer Silberdraht (Durchmesser 300 μm) wurde an die Kathode angeschlossen. Durch die angelegte Spannung bildete sich an der Elektrode eine neue Silberchloridschicht.

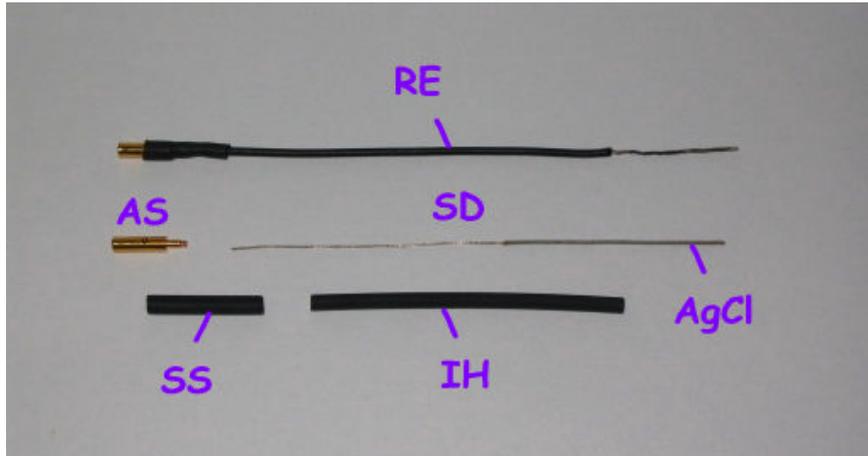


Abb. 2.6: Aufbau der Referenzelektrode. Die verschiedenen Elemente der Referenzelektrode (RE) sind in dieser Abbildung gezeigt. Wichtigster Baustein war der Silberdraht (SD), der an einem Ende von Silberchlorid (AgCl) überzogen wurde. Über den angelöteten Adapterstift (AS) konnte die Elektrode an den Vorverstärker angeschlossen werden. Die Lötstelle wurde von einem Schrumpfschlauch (SS) gesichert. Bis auf das chlorierte Ende wurde der Silberdraht mit einer Isolierungshülle (IH) versehen.

7. Pipetten

Bei den verwendeten Pipetten handelte es sich um dünnwandige Glaskapillaren aus Borosilikat mit Filament (*GB150-TF8P*, *Science Products GmbH*, Hofheim, Deutschland), die einen äußeren Durchmesser von 1,5 mm, einen Innendurchmesser von 1,05 mm und eine Länge von 80 mm haben. Diese Glasröhrchen wurden mit dem horizontalen Puller (*DMZ-Universal-Puller*, *Zeitz*, München, Deutschland) gezogen und poliert. Die Kapillare wurde dabei schrittweise erhitzt und gleichzeitig gedehnt bis sie schließlich in der Mitte an der dünnsten Stelle auseinander riss. Die so entstandenen Pipetten wurden beim Poliervorgang durch erneutes kurzes Erhitzen geglättet und dadurch bei unveränderten elektrischen Eigenschaften eine Verbesserung der *Sealfähigkeit* erreicht. Für die Experimente wurden niederohmige Pipetten mit Widerständen zwischen 2,5 und 4,5 M Ω verwendet.



Abb. 2.7: DMZ Universal Puller. Die Herstellung von Pipettenspitzen aus einer Glaskapillare (GK) ist hier dargestellt. Das Glühfilament (GF) erhitzte die Röhrenmitte bis der Zug des Pullers die Kapillare auseinander riss und zwei Pipettenspitzen entstanden.

Durch entsprechende Programmierung des *Pullers* mit zwei *Vorpulls* und einem zweiphasigen *Hauptpull* konnten diese Werte problemlos hergestellt werden. Entscheidend war dabei die Zeit zwischen der ersten und zweiten Phase des *Hauptpulls*, welche als *Delay Pull 1 tF(1)* bezeichnet wurde und den Pipettenwiderstand maßgeblich bestimmte.

Um die Kapazität der Pipetten zu verringern, wurden die Spitzen mit dem Elastomer *R-6101* (*Dow Chemical, Midland, USA*) beschichtet. Aus einem bei -28°C im Gefrierschrank aufbewahrten Reservoir wurde eine kleine Menge in eine 2 ml Spritze aufgezogen und nach Erreichen der Raumtemperatur zum Beschichten verwendet. Diese 2 ml-Elastomerspritze konnte über Wochen verwendet werden, wenn sie über Nacht im Kühlschrank gelagert wurde. Zur Beschichtung wurde die Pipette in eine Haltevorrichtung mit Stereomikroskop (*SZ-4045-CTV, Olympus, Hamburg, Deutschland*) eingespannt und ein kleiner Tropfen *R-6101* aufgetragen. In Abbildung 2.8 ist dieser Vorgang dargestellt.

Unter Drehung der Pipette konnte das Elastomer mit der Spritzenspitze verteilt und anschließend mit einem Heizdraht gehärtet werden. Um dabei das Borosilikatglas nicht zum Schmelzen zu bringen, wurde die Pipette samt *R-*

6101 für 10 Sekunden einer Temperatur von 150°C ausgesetzt, was für die Härtung ausreichte aber den Schmelzpunkt des Glases nicht erreichte. Die Verkleinerung der elektrisch aktiven Fläche der Pipettenspitze senkte die Kapazität um 2 bis 3 pF, verbesserte die Möglichkeiten eines Kapazitätsausgleichs und konnte damit das kapazitativ bedingte Rauschen senken.

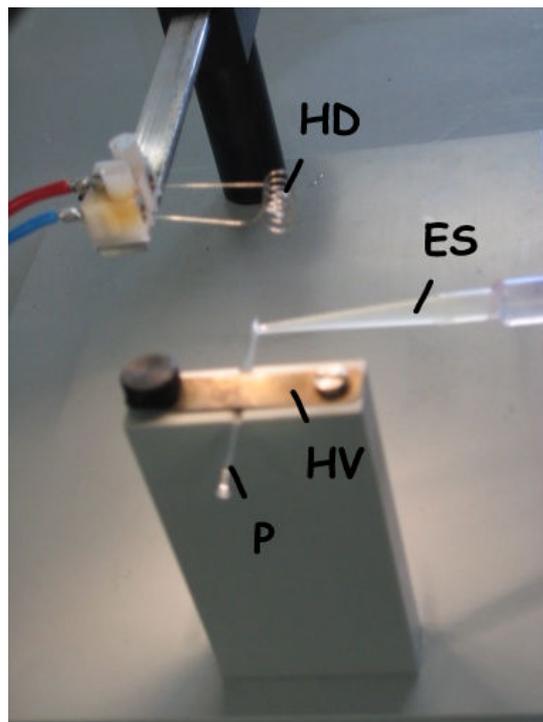


Abb. 2.8: Beschichtung mit R-6101. Die in der Haltevorrichtung (HV) eingespannte Pipette (P) wurde mit Hilfe einer Insulinspritze mit dem Elastomer (ES) beschichtet. Mit dem Heizdraht (HD) wurde es dann auf 150°C erhitzt und konnte aushärten.

Die Pipette konnte dann mittels *Microloader* (*Eppendorf*, Hamburg, Deutschland) mit Pipettenlösung gefüllt, in den Mikromanipulator eingespannt und zum Messen verwendet werden. Dabei bestand bei beschichteten Spitzen manchmal eine Sichtbehinderung durch das Elastomer, die bei unbeschichteten Pipetten nicht aufgetreten wäre. Dieser einzige Nachteil konnte aber durch sparsamen Einsatz des R-6101 umgangen werden.

8. Mikromanipulator

Zur Ausrichtung der Patchpipette in der Badlösung wurde ein Mikromanipulator (*LN mini/combi, Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland*) eingesetzt, der mit Schrittmotoren ausgestattet war. Damit waren Bewegungen in allen drei Dimensionen des Raumes möglich, wobei man zwischen elektrischem Tastenbetrieb mit einer schnellen (6 mm/s) und einer langsamen (0,24 mm/s) Geschwindigkeit sowie hydraulischem Handradbetrieb wählen konnte. Die schnelle Stufe erlaubte eine grobe Ausrichtung der Messelektrode, die für das Eintauchen in die Badlösung ausreicht. Die langsamere Komponente wurde zum Positionieren über der Zelle verwendet. Beim letzten Annähern an die Zelle wurde der Handradbetrieb mit einer Schrittweite von 0,1 μm verwendet.

Da nach dem *Sealen* die Verbindung durch Erschütterungen oder Bewegungen wieder zerstört werden könnte, wurde der Mikromanipulator direkt am Objektivtisch des Mikroskops befestigt. Mit diesem Aufbau wurden Erschütterungen gleichförmig auf Pipettenspitze und Zelle übertragen und damit Relativbewegungen verhindert.

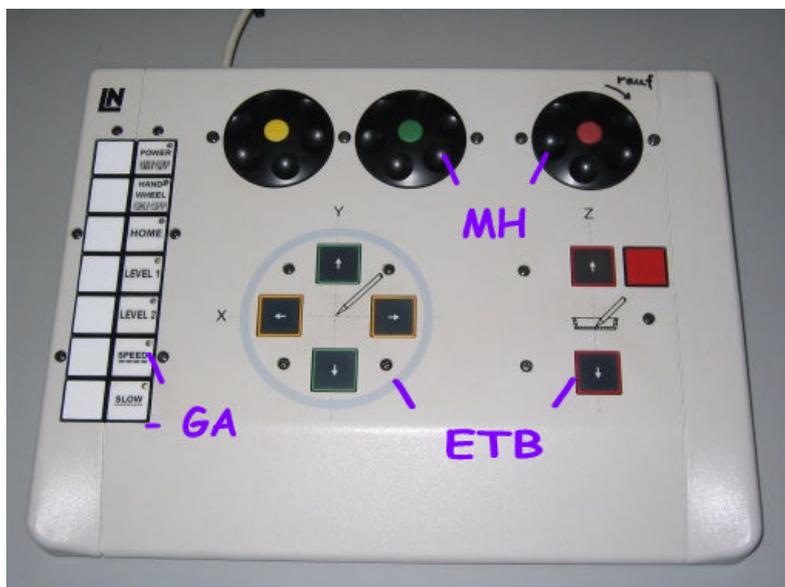


Abb. 2.9: Steuerung des Mikromanipulators. Das Steuerpult des Mikromanipulators verfügte über eine schnelle und eine langsame Geschwindigkeitsauswahl (GA). Die Bewegung der Pipette erfolgte entweder per elektrischen Tastenbetriebs (ETB) oder manueller hydraulischer Steuerung (MH).

9. Ganzzelleleitung

Um die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanäle zu erfassen, wurde bei allen Messungen mit der konventionellen Ganzzellkonfiguration gearbeitet. Dazu wurde bei der sogenannten Sealbildung ein sehr enger und elektrisch dichter Kontakt der Pipettenspitze zur Zellmembran hergestellt. Diese Verbindung wies einen hohen elektrischen Widerstand im Gigaohm-Bereich (*giga-seal*) auf, um einen direkten Ionenaustausch zwischen Bad- und Pipettenlösung zu verhindern. Ansonsten hätten Leckströme den durch die Kanalproteine produzierten Stromanteil überlagert und die Messungen verfälscht.

Um anschließend in die Ganzzellkonfiguration zu gelangen, wurde der Membranfleck unter der Pipettenöffnung mit Unterdruck aufgerissen und damit eine Verbindung zwischen Pipettenlumen und Zellinnerem hergestellt. Beim Übergang vom Extra- in den Intrazellulärraum wurde das Membranpotential berücksichtigt und das Ruhepotential auf -80 mV eingestellt. Um die Zelle keinen zu großen Potentialänderungen auszusetzen, wurde schon kurz vor dem Aufreißen auf eine Spannung von -60 mV gewechselt. Ein erfolgreicher Zugriff auf den Intrazellulärraum war dadurch erkennbar, dass der Widerstand auf Werte von 5 bis 10 M Ω abfiel und die Kapazität entsprechend der Größe der Zelle zunahm.

Nach Erreichen der Ganzzellkonfiguration konnten die einzelnen Experimente durchgeführt und zum Beispiel Spannungen nach dem Aktivierungs- oder *Longstep*protokoll appliziert werden. Wegen der relativ großen Ströme war dabei eine Kompensation des Serienwiderstandes nötig (siehe unten).

10. Liquid-Junction-Potential

Treten zwei Lösungen mit unterschiedlichen Ionenkonzentrationen, wie zum Beispiel Pipetten- und Badlösung, miteinander in Kontakt, so sind sie bestrebt, diese Ionenunterschiede auszugleichen. Der daraus resultierende Strom stört

elektrophysiologische Messungen und musste in den durchgeführten Untersuchungen berücksichtigt werden. Deshalb wurde die Spannung ermittelt, die am Übergang der beiden Elektrolytlösungen entstand, das sogenannte *Liquid-Junction-Potential*.

Dieses *Liquid-Junction-Potential* wurde mit dem Computerprogramm *Clampex* errechnet und bei den Messungen neutralisiert. Bei der Badlösung mit physiologischem Kaliumgehalt von 5,4 mM betrug es +8,0 mV, während bei der Hochkaliumlösung mit 130 mM ein Wert von +4,9 mV kalkuliert wurde. Bei der Korrektur mit Hilfe des *Pulse*-Programms wurde die Vorzeichenänderung bei Messungen in der Ganzzellkonfiguration automatisch berücksichtigt.

11. Offset-ausgleich

Nach dem Eintauchen der Pipettenspitze in die Badlösung wurde selbst bei 0 mV applizierter Spannung oft schon ein Stromfluss registriert. Dieser Stromfluss wird als *Offset* bezeichnet und kam durch die vorhandenen Potentialunterschiede an den Übergängen der einzelnen Komponenten der Messkette zustande beispielsweise zwischen Messelektrode und Pipettenlösung oder zwischen Badlösung und Referenzelektrode. Um bei den Messungen nur den von den Kanälen erzeugten Strom zu erhalten, musste diese Abweichung korrigiert werden. Dazu wurde die Pipette einige Mikrometer über der Zelle in der Badlösung positioniert und die Spannung, bei der kein Strom floss, als Nullpotential definiert. Bei den verwendeten Verstärkern *EPC 9* und *EPC 10* wurde dieses Potential durch Aktivierung der *Offset*-Routine vom *Pulse*-Programm automatisch gesucht und eingestellt.

12. Kompensation des Serienwiderstandes

Die im Pulsgenerator erzeugten, programmierten Potentialabläufe konnten die Zellmembran und Kanäle nicht unverfälscht erreichen, sondern wurden zuvor durch die elektrischen Eigenschaften der Messapparatur beeinflusst. Die

Widerstände der einzelnen Stromleiter, die in der Summe den Serienwiderstand ausmachten, konnten die angelegte Spannung reduzieren. Bei allen hier untersuchten Kanälen wurden bei Strömen im nA-Bereich Spannungsabfälle verursacht, die eine Kompensation erforderlich machten.

Im verwendeten *Pulse*-Programm war hierfür eine Funktion eingerichtet, mit der man die Charakteristika des Ausgleichs einstellen konnte. Es wurde eine 70prozentige Kompensation gewählt. Diese Vorgabe konnte noch gut umgesetzt werden. Höhere Kompensationsgrade führten zu unerwünschten Stromschwankungen und -schwingungen und hätten die Messungen unbrauchbar gemacht.

13. Durchführung der Experimente

Die Kulturschälchen mit den transfizierten Zellen wurden 1 Minute lang mit 300 µl 0,05 prozentigem Trypsin (*PAA Laboratories GmbH*, Linz, Österreich) mit 0,02 prozentigem EDTA-Zusatz behandelt und auf 6 bis 10 Schälchen verteilt. Dadurch wurde die Oberfläche der Zellen von störenden Proteinen befreit, eventuell gekoppelte Zellen getrennt und durch die Verteilung eine bessere Übersicht geschaffen. Außerdem konnten sich instabile Zellen nicht mehr anheften und wurden abgesaugt. Die Zellen mit stabiler Stoffwechselsituation wurden somit selektiert.

Eine halbe Stunde nach der Trypsinbehandlung hatten die Zellen über Glykokalixbestandteile wieder festen Kontakt zum speziell beschichteten Schälchenboden gewonnen und konnten gepatcht werden. Nachdem eine gefüllte Pipette eingespannt und die Referenzelektrode angebracht war sowie die transfizierten Zellen von Badlösung umspült wurden, konnte man sich eine geeignete Zelle auswählen. Man konzentrierte sich dabei auf Zellen, die nach Anregung mit blauem Licht grün fluoreszierten. Diese Zellen hatten die Gene des *Enhanced Green Fluorescens Protein* erfolgreich exprimiert und damit höchstwahrscheinlich auch das kotransfizierte Kanalgen, das mit einer zehnfach höheren Konzentration angeboten worden war. Außerdem beurteilte man die Form und Oberflächenbeschaffenheit. Dabei war die

Sealwahrscheinlichkeit bei spindelförmigen Zellen mit gleichmäßiger Oberfläche und ohne Zellfortsätze am höchsten.

Einige Mikrometer über dieser Zelle musste dann die Pipettenspitze positioniert werden. Um dabei ein Verstopfen der Öffnung zu vermeiden, wurde auf die Patchpipette ein Überdruck von 10 cm Wassersäule gegeben und die Pipette dann mittels Mikromanipulator in die Badlösung eingetaucht und über die Zelle bewegt. Dies geschah unter Sichtkontrolle mit Hilfe des Mikroskops oder der *CCD-Kamera (KamPro02, EHD, Damme, Deutschland)* und dem Schwarz-Weiß-Monitor (*Mon12HR, EHD, Damme, Deutschland*). Der Kontakt von Pipetten- und Badlösung und damit die elektrische Verbindung zwischen Mess- und Referenzelektrode konnte außerdem als Stromantwort auf die angelegte Rechteckspannung (0 mV, +5 mV, -5 mV und 0 mV für jeweils 5 ms) nachgewiesen werden. Bevor man dann die Pipettenspitze auf der Zelloberfläche aufsetzte, wurde ca. 2 μm über der Zelle der *Offset*-Ausgleich durchgeführt und der Pipettenwiderstand dokumentiert.

Zur Sealbildung wurde die Pipette langsam auf die Zelle zu bewegt. Die Amplitude des fließenden Stroms stellte dabei eine gute Orientierungshilfe dar, indem sie den Abstand der Pipettenspitze zur Zellmembran anzeigte. Bei Reduktion der Stromhöhe auf circa 70 Prozent des Ausgangswertes war eine Position erreicht, bei der ein *gigaseal* am wahrscheinlichsten zu erwarten war. Nachdem an dieser Stelle der Überdruck von der Pipette genommen wurde, bildete sich manchmal spontan ein *gigaseal* aus. Meistens musste die Sealbildung aber durch vorsichtiges Ansaugen unterstützt werden bevor in die *Cell-Attached*-Konfiguration gewechselt werden konnte. Mit dem Ausführen des *sealpulse* (Rechteckspannung mit ± 5 mV für je 100 ms) wurden dann die Eigenschaften der Verbindung getestet und dokumentiert.

Ausgehend von dieser Konfiguration wurde, wie oben ausführlich beschrieben, durch Anlegen eines Unterdrucks der gepatchte Membranfleck aufgerissen und so die Ganzzelleableitung erreicht. Schnelles und präzises Arbeiten war hier von größter Bedeutung, um die Zelle durch den Unterdruck und die wechselnden Spannungsverhältnisse nicht zu sehr zu strapazieren. War nun der direkte Zugriff auf das Zellinnere gegeben, lieferte der sogenannte *Kv-Test* einen ersten Überblick über die Eigenschaften der exprimierten Kanäle.

Die Stromantwort auf die dabei angelegte Spannung von +20 mV eignete sich gut um den Stromverlauf der später durch geführten Spannungsprotokolle abzuschätzen und Einstellungen wie *Gain* oder Cursorplatzierung entsprechend anzupassen. Wie sich schnell herausstellte, war fast immer eine Kompensation des Serienwiderstandes notwendig, so dass entschieden wurde, sie bei allen Messungen anzuwenden.

Schließlich konnte man mit den Messungen beginnen und die einzelnen Spannungskurven applizieren um die Kanaleigenschaften zu erfassen. Dafür standen Spannungsprotokolle zur Verfügung, mit denen Untersuchungen der Aktivierungs- und Inaktivierungscharakteristika möglich waren.

14. Spannungsprotokolle

An dieser Stelle werden die verwendeten Spannungsprotokolle vorgestellt. Die Programmierung der Potentialverläufe erfolgte mit Hilfe des *Pulse*-Programmes, das hierfür eine Designfunktion zur Verfügung stellt. Im Ausgangszustand vor der Sealbildung wurde eine Rechteckspannung angelegt, die für jeweils fünf Millisekunden erst auf +5 mV und dann auf -5 mV wechselt. Nach Aufsetzen der Pipette auf die Zellmembran und erfolgreicher *Gigaseal*-bildung wurde einmalig der so genannte *sealpulse* ausgelöst, bei dem es sich ebenfalls um eine Rechteckspannung mit ± 5 mV handelte, wobei das Zeitintervall jedoch auf jeweils 100 Millisekunden erhöht wurde. Die resultierende Stromkurve gab eine gute Auskunft über die Qualität des *gigaseal* und sollte optimalerweise nur einen minimalen Stromfluss anzeigen. Anschließend wurde der Membranfleck unter dem Pipettenlumen durch Sog aufgebrochen und die *whole-cell*-Konfiguration hergestellt. Dann wurde mit dem sogenannten *Kv-Test* die Spannung kurzzeitig auf +20 mV erhöht um einen ersten Überblick über den zu erwartenden Stromverlauf zu gewinnen. Die Anpassung der Achsenskalierung oder eine Auswahl einzelner Messpunkte war damit schon vor den eigentlichen Messungen möglich.

Für die dann folgende Testung des Aktivierungsverhaltens in physiologischen oder symmetrischen Kaliumverhältnissen wurde je ein

Spannungsprotokoll angelegt. Das Aktivierungsprotokoll für Messungen in der Badlösung mit einer Kaliumkonzentration von 5,4 mM hielt ein Grundniveau von -80 mV und depolarisierte für je eine Sekunde in 10 mV Schritten bis zu einem Potential von +80 mV. Die Spannung kehrte zwischen den einzelnen Stufen für je eine Sekunde wieder auf das Grundniveau zurück, sodass das Potential zunächst von -80 auf -70 mV, dann von -80 auf -60 mV und so weiter erhöht wurde bis der Sprung von -80 auf +80 mV erreicht war. Der resultierende Stromverlauf war abhängig von der spannungsspezifischen Fraktion der aktivierten Kaliumkanäle und der treibenden elektromotorischen Kraft. Bei dieser Kaliumverteilung zeigte sich aufgrund eines Gleichgewichtspotentials von kleiner als -80 mV immer ein Auswärtsstrom. Die exakte Beschreibung der resultierenden Stromkurven erfolgt im Ergebnissteil dieser Arbeit.

Bei symmetrischer Kaliumverteilung mit intra- und extrazellulären Kaliumkonzentrationen von 130 mM herrschten andere Bedingungen und das so genannte Hochkaliumaktivierungsprotokoll kam zum Einsatz. Ausgehend von -80 mV wurde die Spannung ebenfalls in 10 mV Schritten bis zu einem Potential von +40 mV erhöht. Die Potentialänderung wurde hierbei für 100 Millisekunden aufrechterhalten und verblieb zwischen den einzelnen Stufen für zwei Sekunden auf dem Grundniveau. Aufgrund der ausgeglichenen Kaliumverteilung zeigte sich der interessante Anteil im Stromverlauf nicht während der Depolarisierung sondern kurz danach bei der erneuten Repolarisierung auf -80 mV. Die durch den Spannungssprung geöffneten Kaliumkanäle leiteten hier mit immer derselben treibenden Kraft, sodass der Stromfluss nur noch von der Fraktion der geöffneten Kanäle abhing. Die genaue Darstellung und Interpretation der Stromkurven wird ebenfalls in den folgenden Kapiteln vorgenommen.

Die Beobachtung des Inaktivierungsverhaltens erfolgte in physiologischen Kaliumverhältnissen mit Hilfe des *Longstep*protokolls. Die Spannung wurde dabei ausgehend von -80 mV auf 0 mV angehoben und für 30 Sekunden gehalten. Nach Repolarisation für jeweils zwei Minuten wurde das Protokoll insgesamt dreimal wiederholt.

15. Pipetten- und Badlösungen

Sämtliche verwendeten Pipetten- und Badlösungen wurden im Labor aus Salzen oder Lösungen der Firma *Sigma* (*Steinheim*, Deutschland) und doppelt destilliertem Wasser hergestellt. Bei den Experimenten wurden drei verschiedene Lösungen mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Pipettenlösung:

80 mM KCl; 50 mM K-Glutamat; 3,959 mM CaCl₂; 10 mM HEPES;
10 mM BAPTA; 2 mM Mg-ATP; 2 mM MgCl₂; pH 7,2 eingestellt mit
1 M KOH

Physiologische Badlösung (5,4 mM K⁺):

140 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 10 mM HEPES;
10 mM Glukose; 1 mM MgCl₂; pH 7,4 eingestellt mit 1 M NaOH

Hochkaliumlösung (130 mM K⁺):

130 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 2 mM CaCl₂; 10 mM HEPES;
10 mM Glukose; pH 7,4 eingestellt mit 1 M KOH

Zunächst wurden dafür die benötigten Mengen der Salze mit der *Mettler AE200* Waage nacheinander abgewogen. Zusammen mit den schon flüssigen Substanzen wurden diese anschließend in 95 Prozent des gewünschten Endvolumens destilliertem Wasser gelöst und anschließend der pH-Wert der Lösung mit Hilfe einer Glaselektrode (*ino Lab pH Level 1*, *WTW*, Weilheim, Deutschland) bestimmt. Die Titration auf physiologische Werte erfolgte entweder mit Natron- oder Kalilauge. Nun konnte die Lösung in einen Messkolben überführt und auf das Endvolumen aufgefüllt werden. In einem letzten Schritt wurde die Osmolarität mit dem *Vapor pressure osmometer* (*Wescor*, *Utah*, USA) ermittelt. Nur Lösungen mit Salzkonzentrationen im physiologischen Bereich von 290 bis 310 mosmol konnten dann als Pipetten- oder Badlösung verwendet werden.

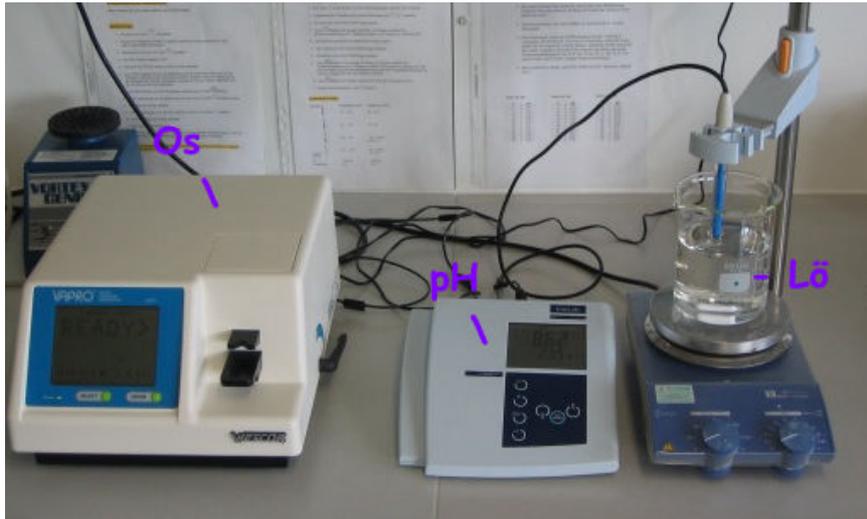


Abb. 2.10: Herstellung einer Lösung. Die Abbildung zeigt die Messung des pH-Werts einer Lösung (Lö) mit dem pH-Meter (pH). Nach Titration auf physiologische Werte wurde mit Hilfe des Osmometers (Os) die Osmolarität bestimmt. Bewegte sich der gemessene Wert zwischen 290 und 310 mosmol konnte die Lösung für Experimente verwendet werden.

16. Pharmaka und Salze

Alle verwendeten Salze und Lösungen stammten von der Firma *Sigma* aus Steinheim in Deutschland.

Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Resultate der Messungen vorgestellt. Im ersten Abschnitt wird dabei zunächst auf die grundsätzlichen Überlegungen eingegangen, die der Erhebung, Berechnung und Darstellung der Daten bei den unterschiedlichen Kaliumverhältnissen zu Grunde lagen. Anschließend werden die Versuche mit den Kanalproteinen aus Transfektionen mit *hKv2.1*, *hKv6.1-IRES-hKv2.1*, *hKv6.3-IRES-hKv2.1* und *hKv6.4-IRES-hKv2.1* dargestellt. Es wurden dabei Daten in physiologischen und symmetrischen Kaliumkonzentrationen mit Hilfe des Aktivierungs-, Hochkaliumaktivierungs- und *Longstep*protokolls erhoben. Die Ergebnisse der Transfektionsansätze ohne Beteiligung von *hKv2.1* sind nicht aufgeführt, da die Monotransfektion mit *hKv6.1*, *hKv6.3* oder *hKv6.4* nicht zu funktionsfähigen Ionenkanälen führte und die Zellen diesbezüglich elektrisch stumm blieben. Der letzte Abschnitt dieses Kapitels enthält die Ergebnisse der Experimente mit der Mutante *hKv2.1H105V* und dem *hKv6.4-IRES-hKv2.1H105V*-Konstrukt in Hochkaliumlösung.

1. Prinzipien der Stromkurvenanalyse

Bei Messungen in Hochkaliumlösung herrschten symmetrische Kaliumverhältnisse. Die Kaliumkonzentration der Badlösung entsprach mit 130 mM der intrazellulären Kaliumkonzentration. Wie im Material und Methoden Teil beschrieben, wurde beim Hochkaliumaktivierungsprotokoll die Spannung von einem Ausgangsniveau von -80 mV in 10 mV Schritten für jeweils 100 ms bis zu einem Potential von +40 mV erhöht. Zwischen den einzelnen Depolarisierungsstufen kehrte die Spannung für jeweils zwei Sekunden wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Es musste bei der Analyse der resultierenden Stromantwort beachtet werden, dass der relevante Stromverlauf bei ausgeglichenen Kaliumverhältnissen nicht beim Depolarisationsvorgang

sondern bei der darauf folgenden Repolarisation auf -80 mV zu finden war. Dieser Abschnitt der Stromkurve wird im Englischen als *tail-current* bezeichnet. Zunächst wurden die spannungsabhängigen Kanäle durch die Depolarisierung aktiviert und bildeten je nach Vorzeichen und Höhe der angelegten Spannung einen mehr oder weniger ausgeprägten Einwärts- oder Auswärtsstrom. Kehrete das Potential dann nach 100 Millisekunden wieder auf das Ausgangsniveau von -80 mV zurück, war die Fraktion der geöffneten, aktivierten Kaliumkanäle immer noch vom Ausmaß der vorangehenden Depolarisierung bestimmt. Die treibende Kraft für Kaliumionen hingegen betrug immer -80 mV und war für alle Depolarisationsstufen identisch. Der resultierende Einwärtsstrom war daher ein direktes Maß für die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung der *Kv*-Kanäle.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der maximale *tail-current* nach einer Spannung von +40 mV (I_{\max}) als 1 definiert und alle anderen spannungsspezifischen Strommaxima ins Verhältnis dazu gesetzt (I / I_{\max}). Damit erreichte man Unabhängigkeit von der absoluten Stromhöhe, die unter anderem auch durch das Transfektions- und Expressionsverhalten der Zellen beeinflusst wurde. Die normierten Strom-Spannungs-Beziehungen konnten dann zur Ermittlung des halbmaximalen Aktivierungspotentials und zu Vergleichszwecken heran gezogen werden. Dazu wurden aus mehreren unabhängigen Messungen Mittelwerte gebildet und samt mittlerem Fehler in einem Diagramm aufgetragen. Mit Hilfe der *Fit-Funktion* des *Origin*-Programmes konnten dann optimierte sigmoidale Näherungskurven angepasst werden. Dafür stand die *Boltzmannfunktion* zur Verfügung mit der Gleichung:

$$I / I_{\max} = 1 / (1 + e^{(V_{1/2} - V_m) / k})$$

wobei	I / I_{\max}	den normierten <i>tail-current</i> ,
	$V_{1/2}$	das halbmaximale Aktivierungspotential,
	V_m	das applizierte Membranpotential und
	k	den <i>slope</i> -Faktor darstellen.

Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf Messungen, bei denen eine physiologische Badlösung mit einer Kaliumkonzentration von 5,4 mM verwendet wurde. Zur Charakterisierung des Aktivierungsverhaltens wurden ausgehend von einem Grundniveau von -80 mV die Potentiale in 10 mV Schritten bis +80 mV erhöht und der jeweilige Ionenfluss registriert. Zwischen den einzelnen Potentialerhöhungen wurde eine Erholungsphase auf dem Ausgangsniveau von -80 mV eingelegt, um vergleichbar viele Kanalproteine in der geschlossenen und aktivierbaren Konformation zu erhalten. Der Stromverlauf zeigte erwartungsgemäß eine spannungsabhängige Zunahme des maximalen Auswärtsstromes mit steigenden Potentialen.

Bei den weiteren Analysen musste die asymmetrische Kaliumionenverteilung berücksichtigt werden. Bei einer intrazellulären Konzentration von 130 mM entstand bereits aufgrund des Konzentrationsgefälles zum Extrazellulärraum mit Kaliumwerten von 5,4 mM ein Ausgleichsbestreben, das als eigenständige treibende Kraft verstanden und entsprechend mit einbezogen werden musste. Nach der im Folgenden dargestellten *Nernstschen* Gleichung ließ sich das Kaliumgleichgewichtspotential E_k berechnen, das dieser Kraft entgegen gesetzt werden musste, um einen konzentrationsbedingten Ionenfluss zu verhindern. Für monovalente Kationen gilt nach *Nernst*:

$$E_k = R \times T / F \times \ln ([K]_o / [K]_i)$$

wobei

E_k	das Kaliumgleichgewichtspotential,
R	die Gaskonstante mit 8,314 AVs/molK,
T	die absolute Temperatur in °K (hier 298 °K),
F	die <i>Faraday</i> -Konstante mit 96485,3 As/mol,
$[K]_o$	die extrazelluläre Kaliumkonzentration und
$[K]_i$	die intrazelluläre Kaliumkonzentration darstellen.

Für physiologische Kaliumverhältnisse ergab sich ein Wert von $E_k = -81,7$ mV. Bei diesem Membranpotential flossen bei physiologischer Kaliumverteilung genau so viele Kaliumionen in die Zelle wie sie gleichzeitig verließen. Der resultierende Kaliumstrom war bei dieser Spannung also gleich Null. E_k wird daher als Gleichgewichtspotential für Kaliumionen bezeichnet. Positivere Potentialwerte verschoben dieses Gleichgewicht in die Richtung des Auswärtsstroms, während bei negativeren Potentialen der Einwärtsstrom überwog. Daraus folgt, dass die tatsächliche elektromotorische Kraft nicht alleine durch die angelegte Spannung erzeugt wurde, sondern vielmehr aus der Differenz von appliziertem Potential und Kaliumgleichgewichtspotential resultierte. Es galt daher:

$$EMK = U - E_k$$

wobei **EMK** die tatsächliche elektromotorische Kraft,
U die angelegte Spannung und
 E_k das Kaliumgleichgewichtspotential waren.

Sollte nun der Effekt der definierten Spannungsänderungen des Aktivierungsprotokolls bewertet werden, wurde nicht der beobachtete Stromfluss heran gezogen, sondern die Leitfähigkeit in Abhängigkeit von beobachtetem Strom und elektromotorischer Kraft nach folgender Formel berechnet:

$$G = I / (U - E_k)$$

wobei **G** die Leitfähigkeit,
I der gemessene Strom,
U die angelegte Spannung und
 E_k das errechnete Gleichgewichtspotential waren.

Auch hier wurden die Leitfähigkeiten im Verhältnis zur maximalen Leitfähigkeit bei +80 mV normiert und als Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung dargestellt. Mehrere unabhängige Messungen dienten dann als Grundlage für die Mittelwertbildung und Anpassung der *Boltzmann*-Näherungskurve.

Das Inaktivierungsverhalten der einzelnen Konstrukte wurde in physiologischen Kaliumkonzentrationen mit dem so genannten *Longstep*-protokoll untersucht. Dabei wurde ausgehend von einem Potential von -80 mV die Spannung auf 0 mV angehoben, für 30 Sekunden gehalten und die Stromantwort dokumentiert. Bei der Auswertung wurden dann jeweils mehrere unabhängige Messungen gemittelt und analysiert. Die absolute Höhe des fließenden Stromes wurde wieder durch Normierung mit Definition des Maximalstromes als 1 in relative und damit vergleichbare Stromanteile umgewandelt. Die Einteilung der Kinetik in zwei Abschnitte mit einem frühen, steilen und einem späten, flacheren Anteil erlaubte die Analyse durch biexponentielle Beschreibung. Monoexponentielle Funktionen waren für die Charakterisierung der gesamten Kurve nicht geeignet. Der bei Näherungen unvermeidliche Fehler bewegte sich hier in inakzeptablen Bereichen. Doch bereits biexponentielle Näherungsansätze zeigten bei für Vergleiche gut geeigneter Standardisierung eine deutliche Reduzierung des Fehlerlevels auf ein akzeptables Niveau. Höherexponentielle Funktionen konnten die Abweichung von der Originalkurve nur noch unwesentlich vermindern ohne dabei entscheidenden zusätzlichen Informationsgewinn zu liefern. Das Inaktivierungsverhalten war also anscheinend durch eine zweigeteilte Kinetik mit einem frühen und einem späten Hauptanteil charakterisiert. Die Unterteilung der Kinetik in konsekutive Abschnitte mit jeweiliger exponentieller Analyse bestätigte diese Vermutung. Es kristallisierten sich zwei exponentielle sich überlagernde Muster heraus, von denen eines den frühen Anteil dominierte, während das andere die späte Inaktivierungskinetik bestimmte. Für die verschiedenen Kanäle konnten daher mit Hilfe des *Origin*-Kalkulationsprogrammes biexponentielle Näherungskurven ermittelt werden. Die Charakterisierung der unterschiedlichen Anteile der Inaktivierung konnte dann unkompliziert mit zwei Zeitfaktoren τ erfolgen, welche den jeweils exponentiellen Stromabfall im frühen und späten Kurvenverlauf beschrieben.

2. hKv2.1

In physiologischen Kaliumverhältnissen zeigten in *CHO-K1*-Zellen transfizierte *hKv2.1* Kanäle bei Applikation von Potentialen nach dem Aktivierungsprotokoll eine typische Stromantwort, welche in Abbildung 3.1 exemplarisch dargestellt ist. Kurz nach der Potentialänderung bei 0,5 Sekunden zeigte sich ein Maximum des Auswärtsstroms. An diesem Punkt waren die meisten aktivierten Kanalproteine im geöffneten Zustand. Sie gingen dann sukzessive in eine inaktivierte Konformation über, in der sie nicht mehr aktivierbar waren und der Strom wieder abnahm. Nach Zurückkehren auf das Ausgangsniveau von -80 mV regenerierten die Proteine wieder zu einer geschlossenen aber aktivierbaren Konformation und konnten beim nächsten Spannungswechsel erneut geöffnet werden. Man erkennt eine Zunahme des maximalen Stromes in Abhängigkeit von der Höhe der angelegten Spannung.

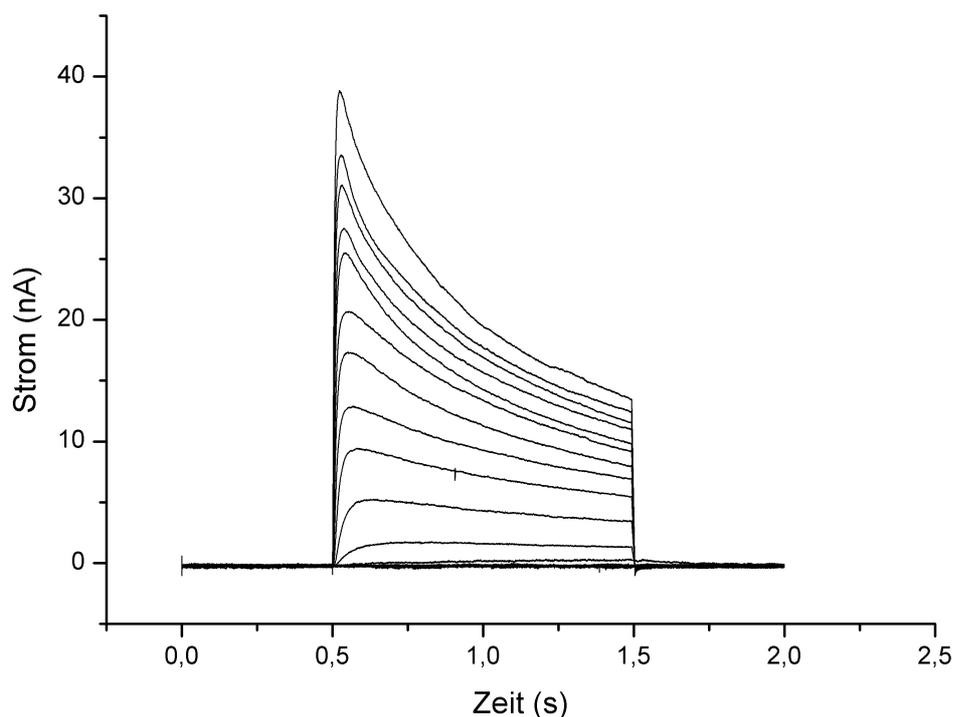


Abb. 3.1: Typische Stromantwort des *hKv2.1*-Kanals auf das Aktivierungsprotokoll bei einer physiologischen extrazellulären Kaliumkonzentration von $5,4$ mM. Mit der Spannungsklemme wurde im *whole-cell*-Modus stufenförmig das Potential von -80 auf $+80$ mV in 10 mV-Schritten erhöht. Zwischen den einzelnen Stufen kehrte die Spannung wieder auf den Ausgangswert von -80 mV zurück. Man erkennt eine spannungsabhängige Zunahme des maximalen Auswärtstromes.

Nach Anfertigung einer Leitfähigkeits-Spannungs-Kurve, zeigte sich eine sigmoidale Kinetik. In Abbildung 3.2 sind die Mittelwerte und der mittlere Fehler von fünf Messungen sowie die mit dem *Boltzmann-Fit* ermittelte Näherungskurve dargestellt. Die errechnete Spannung, die zu einer halbmaximalen Aktivierung führte, lag bei $+4,5 \pm 1,0$ mV.

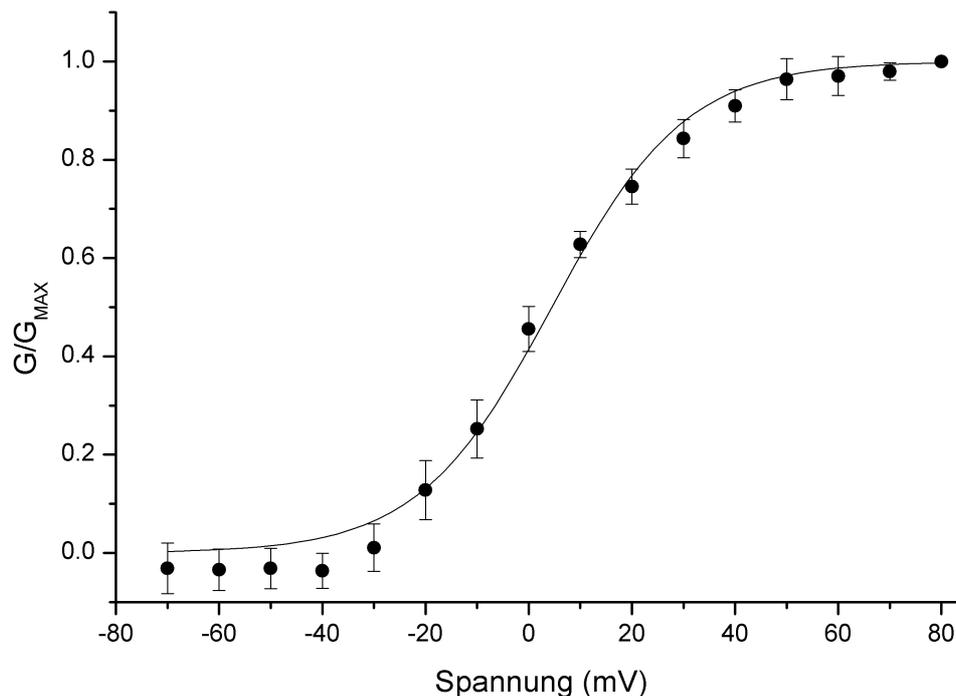


Abb. 3.2: Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung des hKv2.1-Kanals in physiologischer Badlösung mit einer Kaliumkonzentration von 5,4 mM. Aus fünf unabhängig voneinander erhobenen *voltage-clamp*-Messungen in der *whole-cell*-Konfiguration sind die Mittelwerte der Leitfähigkeiten durch Kreise und die mittleren Fehler durch senkrechte Linien dargestellt. Die sigmoidale Kurve repräsentiert die mit Hilfe der *Boltzmannfunktion* optimierte Näherungskurve. Das halbmaximale Aktivierungspotential lag bei $+4,5 \pm 1,0$ mV.

In Hochkaliumlösung lieferten *CHO-K1*-Zellen, die mit dem *hKv2.1* Klon transfiziert wurden, bei Experimenten mit dem Hochkalium-Aktivierungsprotokoll eine typische Stromantwort, die in Abbildung 3.3 zu sehen ist. Die Spannung wurde von einem Ausgangsniveau von -80 mV in 10 mV-Schritten bis +40 mV angehoben. Die Kanalproteine wurden durch die Depolarisation aktiviert und ein Stromfluss beobachtet. Aber erst der Einwärtsstrom im dann folgenden Kurvenabschnitt, bei dem die Spannung wieder auf -80 mV zurückkehrte, gab Aufschluss über das Aktivierungsverhalten dieses Kanalproteins. Da hier die

treibende Kraft mit immer -80 mV konstant blieb, wurde der so genannte *tail-current* nur durch die Anzahl der geöffneten Ionenkanäle und damit nur durch das spannungsabhängige Öffnungsverhalten bestimmt. Erfasste man zu jedem Potential den maximalen *tail-current* und normierte ihn auf das Maximum bei $+40$ mV, erhielt man die jeweiligen spannungsspezifischen Stromanteile. In Abbildung 3.4 sind Werte aus fünf verschiedenen Messungen gemittelt und samt mittlerem Fehler gegen die Spannung aufgetragen. Mit dem *Boltzmannfit* konnte eine Näherungskurve angepasst werden. Das halbmaximale Aktivierungspotential lag bei $-12,5 \pm 1,2$ mV.

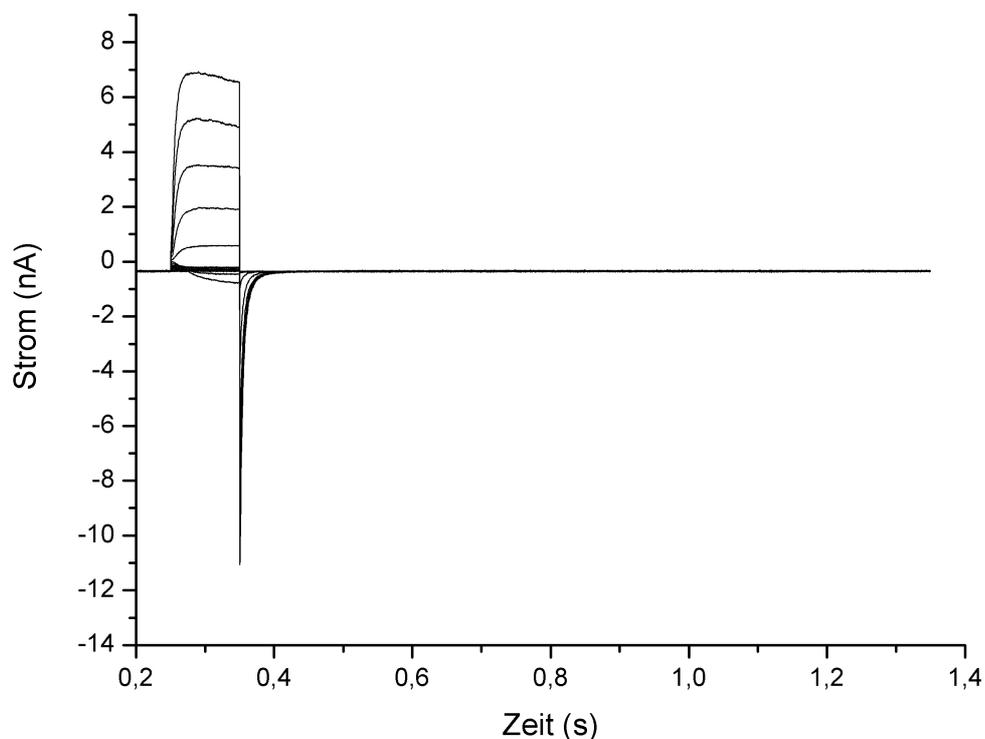


Abb. 3.3: Verhalten des *hKv2.1*-Kanals bei Aktivierung in Hochkaliumlösung. Die Messung wurde mit der *voltage-clamp*-Methode im *whole-cell*-Modus mit dem Hochkalium-Aktivierungsprotokoll erhoben. Sowohl die extra- als auch die intrazelluläre Kaliumkonzentration betrug 130 mM. Die Depolarisierung erfolgte für jeweils 100 ms. Nachdem die Spannung dann wieder auf das Ausgangsniveau zurückkehrte, beobachtete man einen Einwärtsstrom. Dieser wird auch als *tailcurrent* bezeichnet und nahm mit zunehmender Höhe der voran gehenden Depolarisierung zu.

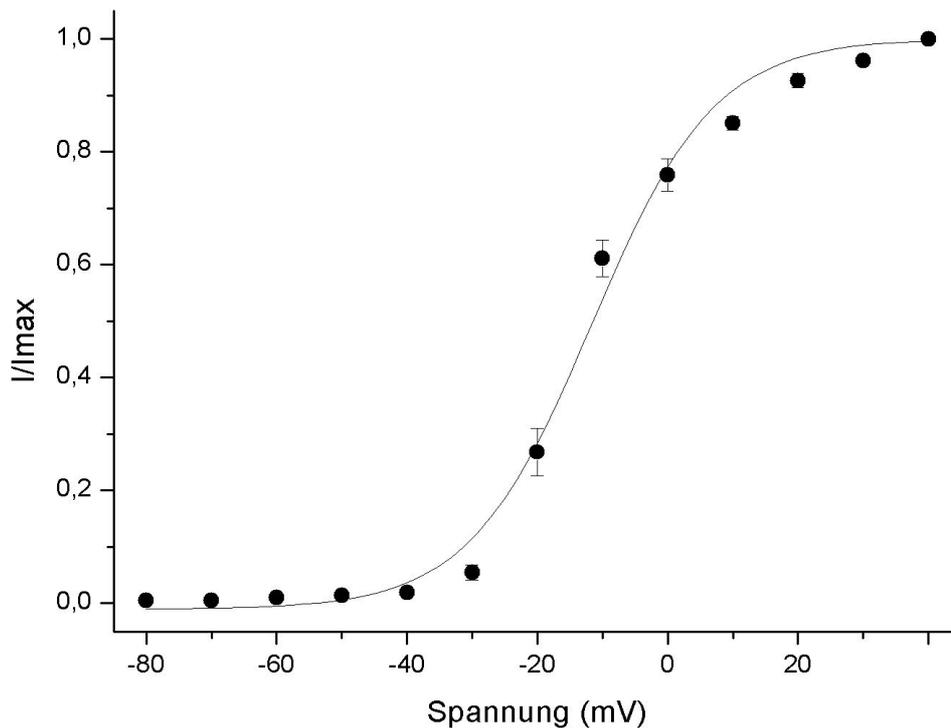


Abb. 3.4: Strom-Spannungs-Beziehung des *tail-current* von *hKv2.1* in Hochkaliumlösung ([K⁺] = 130 mM). Die Mittelwerte aus fünf Messungen wurden als Kreise und die jeweiligen mittleren Fehler als senkrechte Balken aufgetragen. Die *Boltzmannfunktion* zeigte eine sigmoidale Näherungskurve durch diese Werte. Für die halbmaximale Aktivierungsspannung wurde ein Wert von $12,5 \pm 1,2$ mV errechnet. Die Daten wurden mit der *voltage-clamp*-Methode im *whole-cell*-Modus aus fünf voneinander unabhängigen Messungen erhoben.

Die Resultate der Messungen mit dem *Longstep*protokoll zur Charakterisierung des Inaktivierungsverhaltens sind in Abbildung 3.5 dargestellt. Der Graph zeigt den Mittelwert mit mittlerem Fehler von neun Messungen mit *hKv2.1*. Die Zeitkonstante für den ersten, schnelleren Anteil hatte einen Wert von $\tau = 2,8 \pm 0,6$ s. Für den langsameren zweiten Abschnitt ergab sich ein τ von $7,2 \pm 0,6$ s.

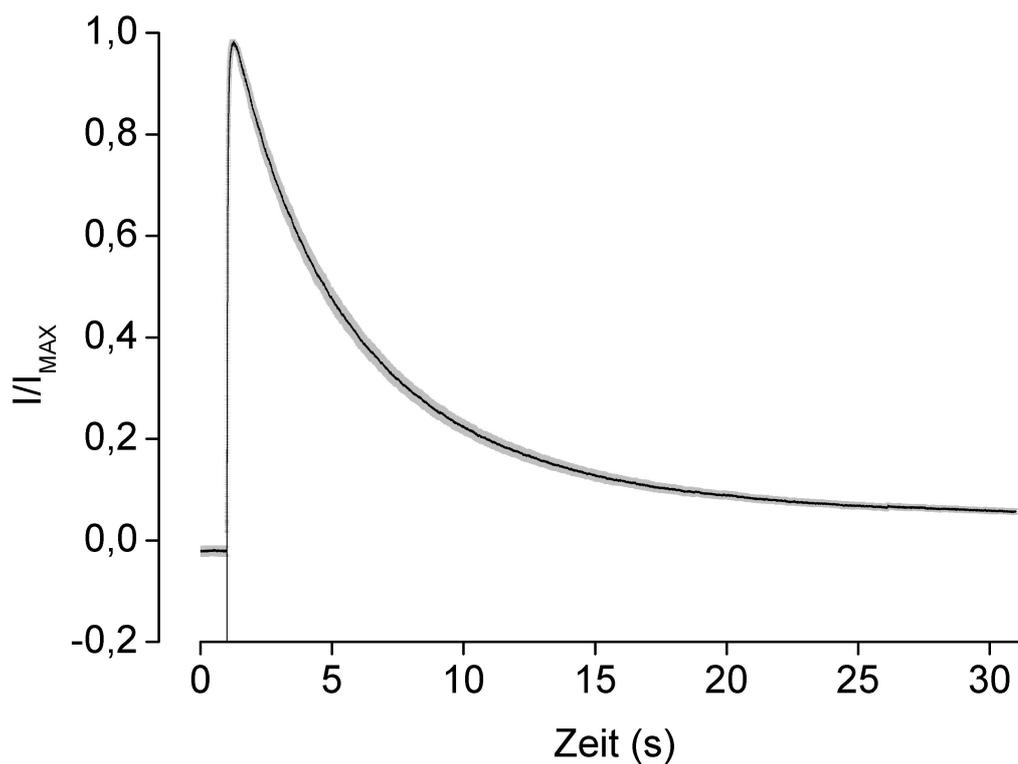


Abb. 3.5: Verhalten von CHO-K1-Zellen mit pcDNA des *hKv2.1*-Kanals transfiziert und für 30 Sekunden einer Spannung von 0 mV ausgesetzt. Aus neun Messungen im *whole-cell*-Modus wurde der Mittelwert der Leitfähigkeiten als schwarze Linie gegen die Zeit aufgetragen. Der jeweilige mittlere Fehler stellt sich als grauer Bereich um den Mittelwert dar. Die Kaliumkonzentration der Badlösung bewegte sich mit 5,4 mM im physiologischen Bereich.

3. hKv6.1-IRES-hKv2.1

Abbildung 3.6 zeigt exemplarisch den Stromfluss des Ionenkanals, der nach Kotransfektion der *hKv6.1*- und *hKv2.1*-Gene in *CHO-K1*-Zellen gebildet wurde. Die Messung wurde mit dem Aktivierungsprotokoll erhoben. Die Mittelwerte mit mittlerem Fehler und *Boltzmann*-Näherungskurve aus vier Experimenten sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Das halbmaximale Aktivierungspotential betrug $1,2 \pm 2,3$ mV.

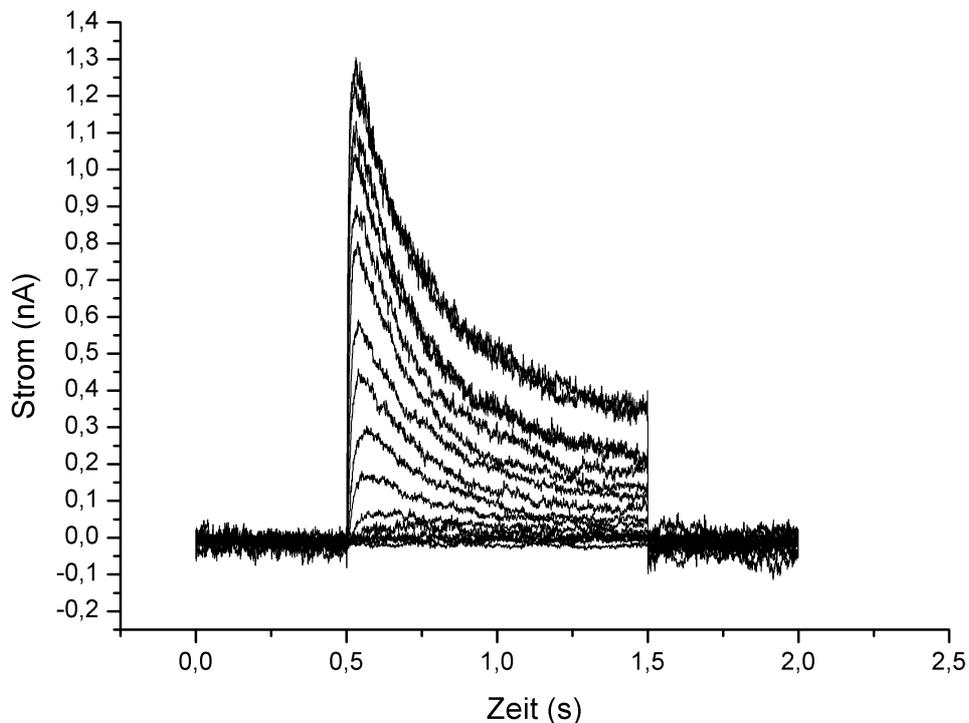


Abb. 3.6: IRES-Konstrukt mit *hKv6.1* und *hKv2.1*, Messung in physiologischer Kaliumkonzentration mit Stimulation nach dem Aktivierungsprotokoll. Es wurde die Spannungsklemmtechnik im *whole-cell*-Modus verwendet.

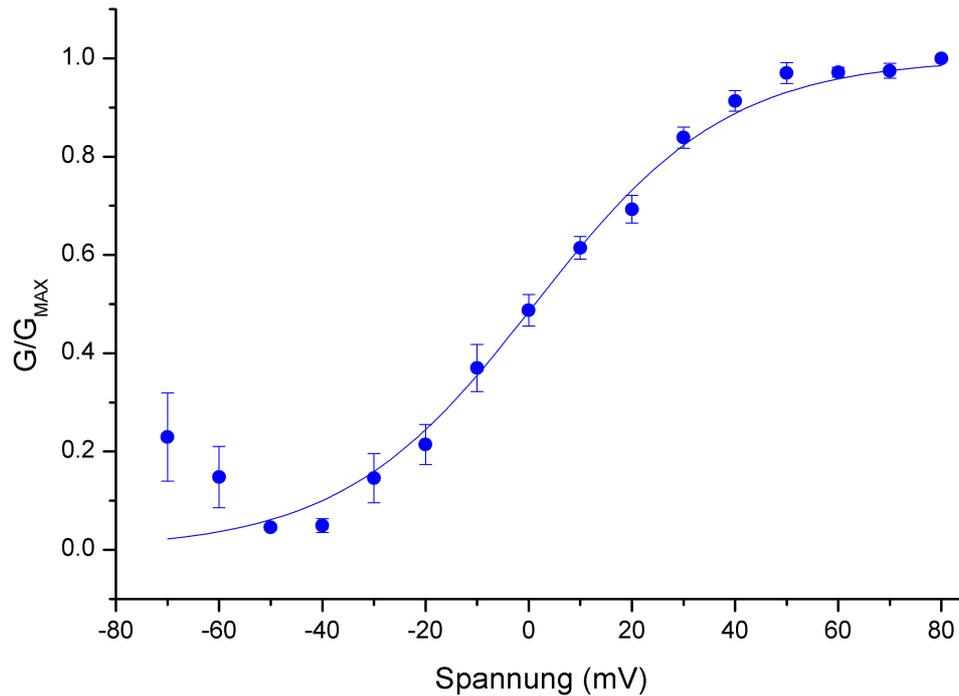


Abb. 3.7: Leitfähigkeit-Spannungs-Beziehung von Transfektionen mit *hKv6.1-IRES-hKv2.1* in physiologischer Badlösung. Die Mittelwerte der normierten Leitfähigkeiten aus vier unabhängig voneinander gewonnenen Messungen wurden mit mittlerem Fehler und optimierter *Boltzmann*-Näherungskurve gegen die Spannung aufgetragen. Sämtliche Daten wurden mit der Spannungsklemme im Ganzzellmodus und physiologischer extrazellulärer Kaliumkonzentration von 5,4 mM an *CHO-K1*-Zellen erhoben. Für die halbmaximale Aktivierung wurde ein Potential von $+1,2 \pm 2,3$ mV benötigt.

In Abbildung 3.8 ist exemplarisch die typische Stromantwort des *hKv6.1-IRES-hKv2.1*-Konstruktes auf Stimulation nach dem Hochkaliumaktivierungsprotokoll dargestellt. Vier unabhängige Messungen wurden zur Mittelwertbildung heran gezogen und zusammen mit mittlerem Fehler in Abbildung 3.9 aufgetragen. Der Wert für das halbmaximale Aktivierungspotential betrug $-20,0 \pm 0,9$ mV.

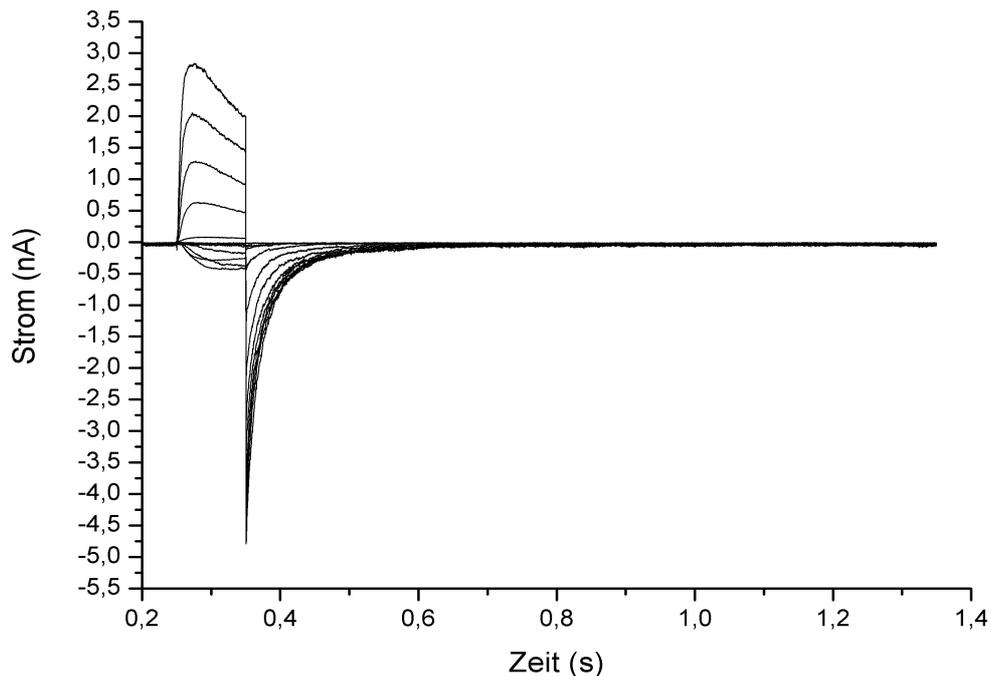


Abb. 3.8: Typische Stromantwort der *hKv6.1-IRES-hKv2.1*-Kanäle beim Hochkaliumaktivierungsprotokoll. Extra- und intrazelluläre Kaliumkonzentration waren mit jeweils 130 mM identisch. Es wurde mit der Spannungsklemme im Ganzzellmodus gearbeitet.

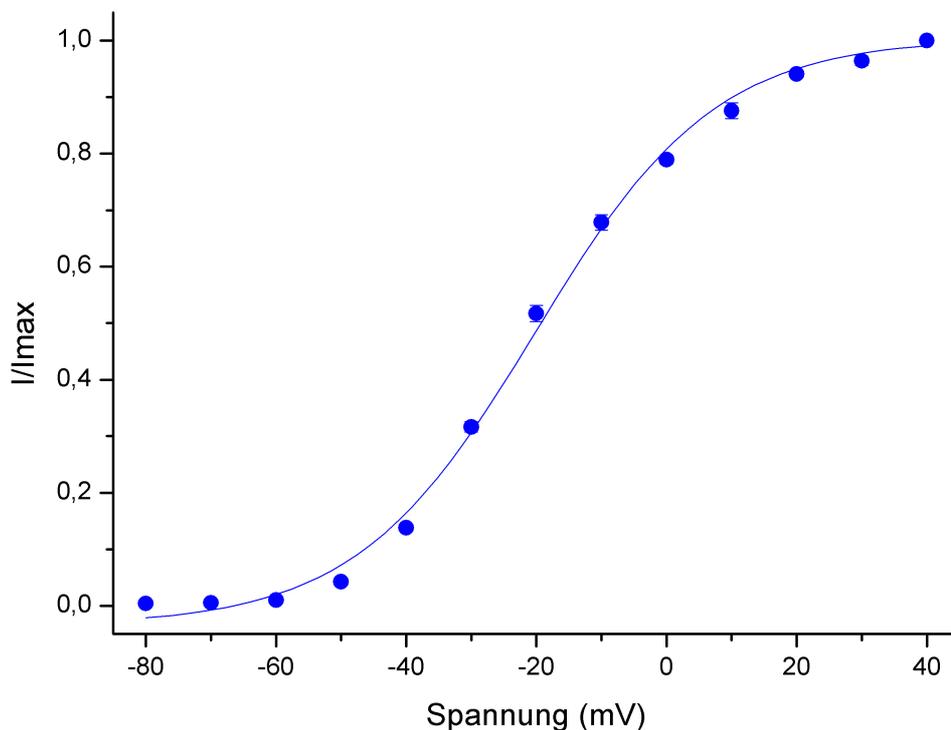


Abb. 3.9: *hKv6.1-IRES-hKv2.1*, Strom-Spannungs-Beziehung bei Aktivierung in Hochkaliumlösung. Vier Messungen lieferten die Daten für mittlere Stromantwort (Kreise) und mittleren Fehler (senkrechte Balken) bei der jeweiligen Spannung. Die optimierte Näherungskurve wurde mit der Boltzmannfunktion ermittelt. Alle vier Experimente wurden im *whole-cell*-Modus mit der *voltage-clamp*-Technik in einer Hochkaliumlösung mit extrazellulärer Kaliumkonzentration von 130 mM durchgeführt. Für das halbmaximale Aktivierungspotential ergab sich ein Wert von $-20,0 \pm 0,9$ mV.

Stimulation mit dem *Longstep*protokoll bewirkten bei *hKv6.1-IRES-hKv2.1* den in Abbildung 3.10 gezeigten Stromverlauf. Sieben Experimente wurden zur Mittelwertbildung heran gezogen. Die Zeit-Werte τ_1 für den frühen, schnellen und τ_2 für den späteren langsameren Stromabfall betragen hier $\tau_1 = 1,8 \pm 0,2$ s und $\tau_2 = 10,2 \pm 0,6$ s.

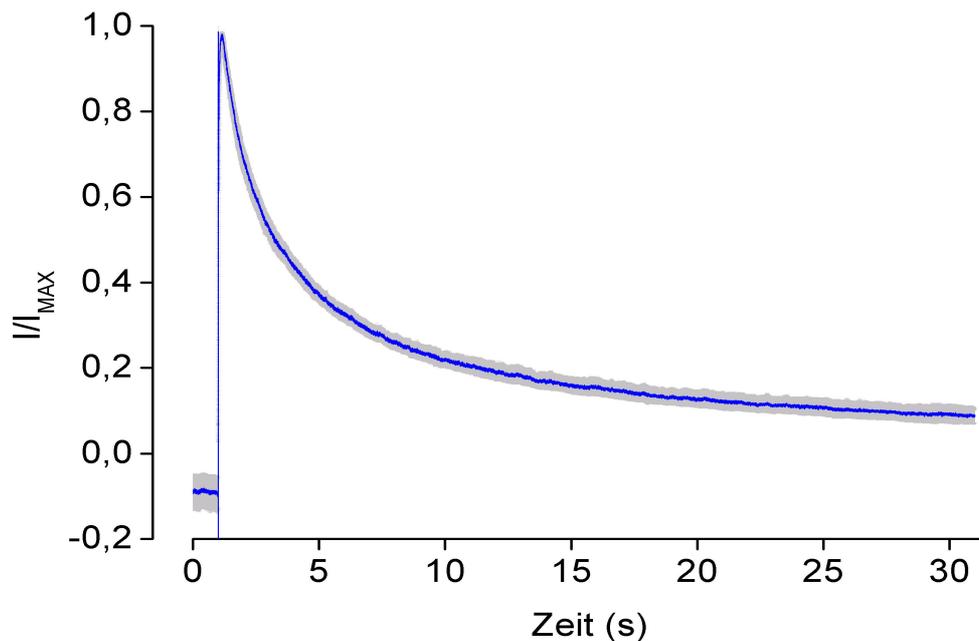


Abb. 3.10: *Longstep*-Messungen von *hKv6.1-IRES-hKv2.1*. In der Graphik sind die Mittelwerte aus sieben untersuchten *CHO-K1*-Zellen blau dargestellt. Der graue Bereich spiegelt den mittleren Fehler wider. Die Daten wurden in physiologischer Kaliumlösung mit der Spannungsklemme im Ganzzellmodus erhoben.

4. hKv6.3-IRES-hKv2.1

Die typische Stromantwort von *hKv6.3-IRES-hKv2.1* Kanälen bei Messungen mit dem Aktivierungsprotokoll ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Direkt darunter zeigt Abbildung 3.12 die normierten Leitfähigkeiten und die *Boltzmannfunktion* von sechs erhobenen Aktivierungskurven. Das Potential, das zum halbmaximalen Stromfluss führte, war hier $-12,4 \pm 1,2$ mV.

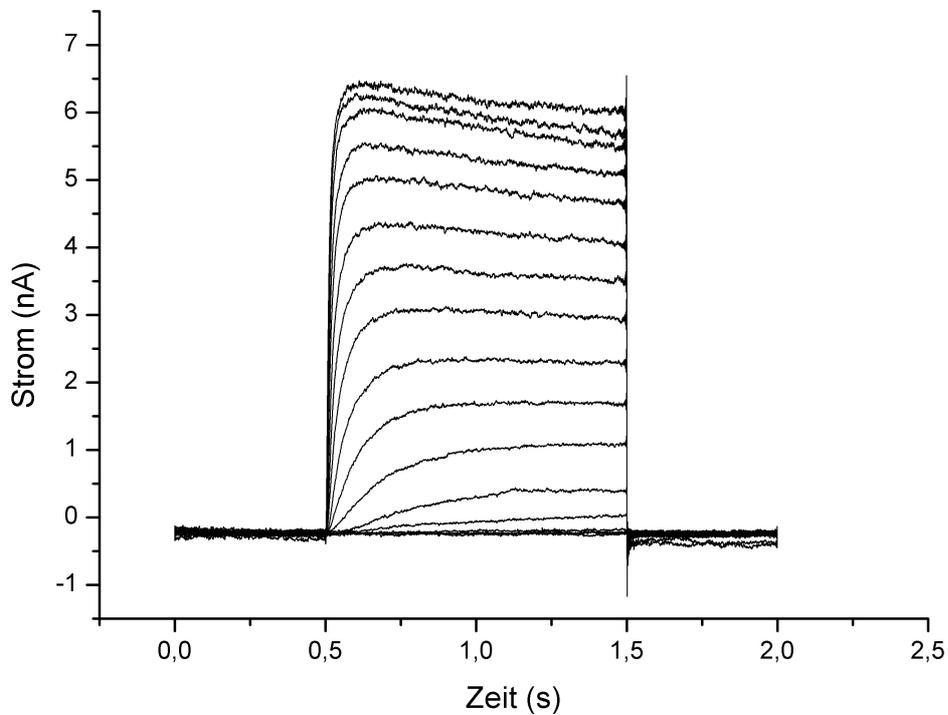


Abb. 3.11: Typische Stromantwort des *hKv6.3-IRES-hKv2.1* in physiologischer Badlösung ($[K^+] = 5,4$ mM) bei Applikation des Aktivierungsprotokolls. Die Messung wurde mit der Spannungsklemme im *whole-cell*-Modus durchgeführt.

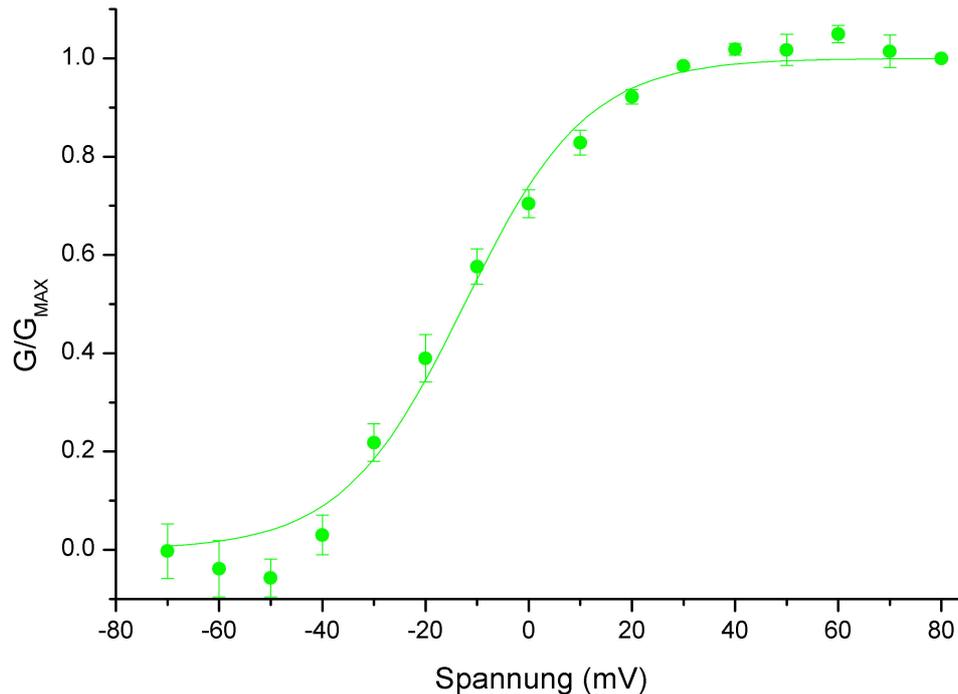


Abb. 3.12: Leitfähigkeit-Spannungs-Beziehung von *hKv6.3-IRES-hKv2.1* in physiologischer Badlösung. Die normierten Leitfähigkeiten von sechs verschiedenen *CHO-K1*-Zellen wurden gemittelt und gegen die Spannung aufgetragen. Die jeweiligen mittleren Fehler sind durch senkrechte Linien repräsentiert. Durch diese Mittelwerte wurde dann mit Hilfe der *Boltzmann*-funktion die Näherungskurve gezogen und als sigmoidale Linie dargestellt. Eine Spannung von $-12,4 \pm 1,2$ mV bewirkte eine halbmaximale Aktivierung. Alle sechs Messungen wurden in der Ganzzelleableitung mit der *voltage-clamp*-Methode und physiologischer extrazellulärer Kaliumkonzentration erhoben.

Mit dem *hKv6.3-IRES-hKv2.1* Konstrukt transfizierte *CHO-K1*-Zellen zeigten bei Messungen mit dem Hochkaliumaktivierungsprotokoll eine Stromantwort, die in Abbildung 3.13 zu sehen ist. In Abbildung 3.14 sind von fünf verschiedenen Zellen Mittelwerte und mittlerer Fehler sowie die Näherungskurve nach dem *Boltzmannfit* dargestellt. Eine halbmaximale Aktivierung erreichte das Konstrukt *hKv6.3-IRES-hKv2.1* bei einem Potential von $-21,0 \pm 0,3$ mV.

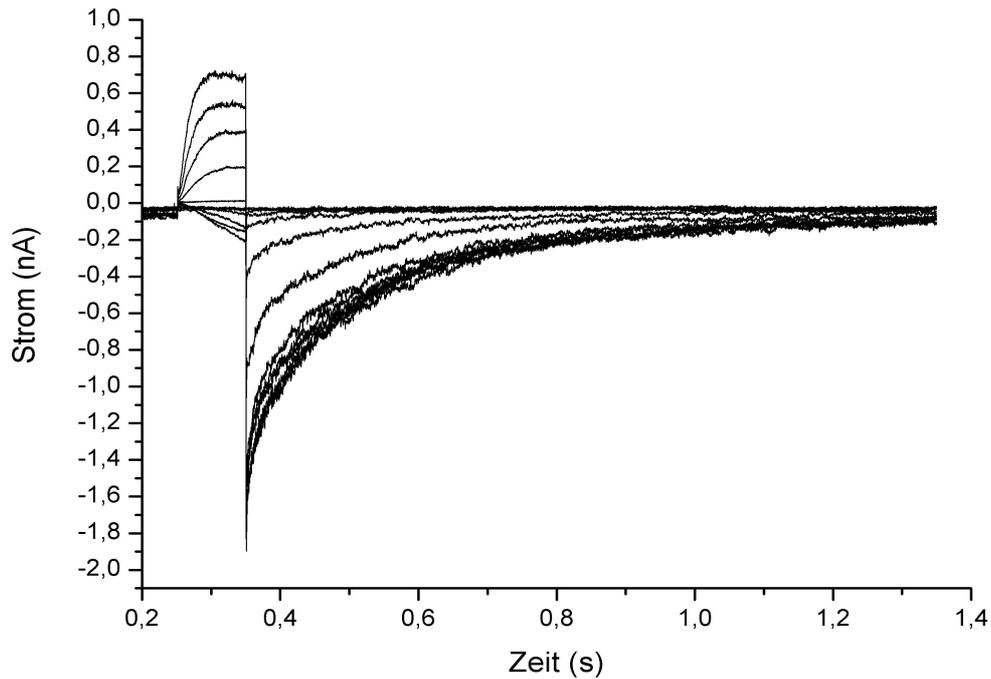


Abb. 3.13: Aktivierung von *hKv6.3-IRES-hKv2.1* in einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 130 mM. Die Spannungsapplikation erfolgte mit der *voltage-clamp*-Methode im *whole-cell*-Modus nach dem Hochkaliumaktivierungsprotokoll.

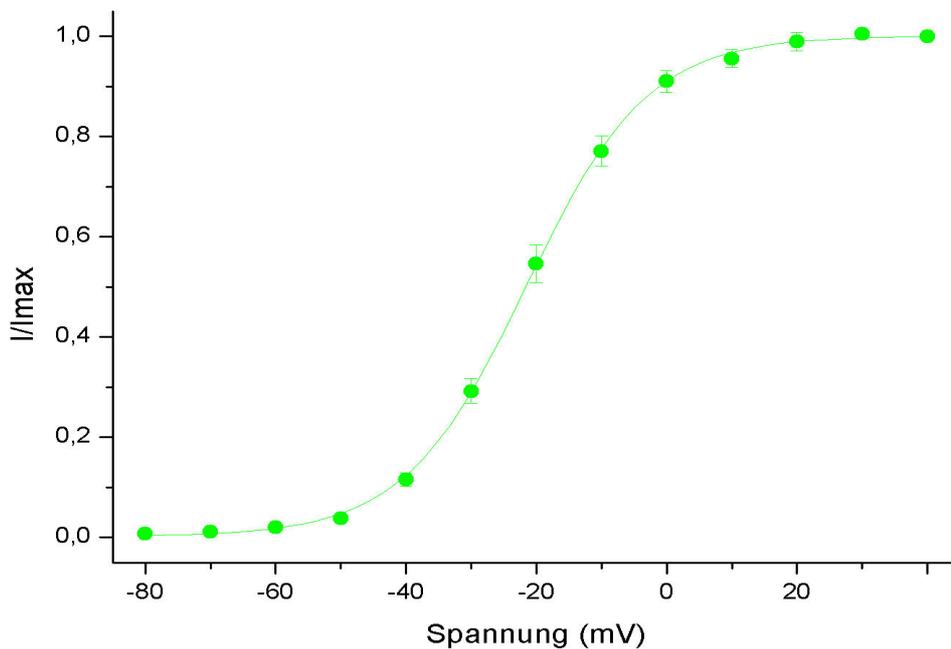


Abb. 3.14: Strom-Spannungs-Beziehung von *hKv6.3-IRES-hKv2.1* in Hochkaliumlösung. Die sigmoidale Kurve wurde mit dem *Boltzmannfit* durch die Mittelwerte (Kreise) der maximalen *tail*-Ströme aus fünf verschiedenen Experimenten gezogen. Der entsprechende mittlere Fehler ist durch die senkrechten Linien angegeben. Die Messungen wurden mit der Spannungs-klemme und der Ganzzelleableitung in Hochkaliumlösung mit einer Konzentration von 130 mM erhoben. Bei einer Spannung von $-21,0 \pm 0,3$ mV floss die Hälfte des maximal möglichen Stromes.

Die Versuchsergebnisse der *Longstep*-Experimente sind in Abbildung 3.15 veranschaulicht. Insgesamt sechs Messungen flossen in den dargestellten Mittelwert mit mittlerem Fehler ein. Für die Zeitkonstanten ergaben sich Werte von $2,8 \pm 0,3$ s für die frühe und $21,6 \pm 1,0$ s für die späte Inaktivierungskinetik.

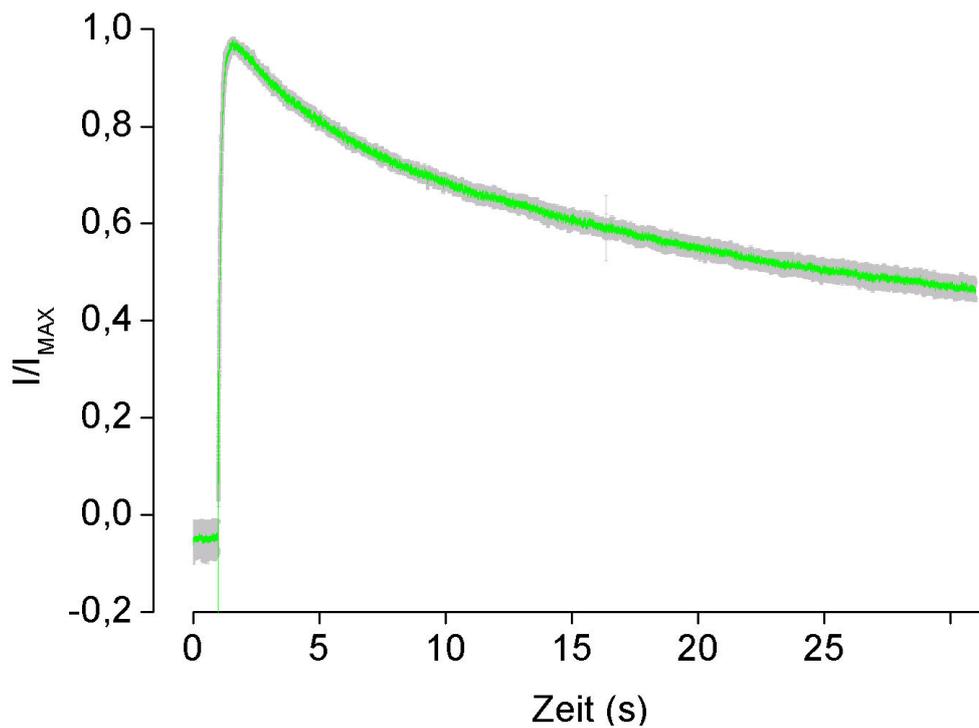


Abb. 3.15: Longstepkurve von *hKv6.3-IRES-hKv2.1*-Kanälen. Die Abbildung zeigt die gemittelten Ergebnisse aus sechs Untersuchungen in physiologischem extrazellulärem Kaliummilieu. Die *CHO-K1*-Zellen wurden mit der Spannungsklemme im *whole-cell*-Modus für 30 Sekunden einem Potential von 0 mV ausgesetzt. Der mittlere Fehler in grau umrahmt den grünen Mittelwert.

5. hKv6.4-IRES-hKv2.1

Abbildung 3.16 stellt die gemessene Stromantwort eines IRES-Konstrukts mit *hKv 6.4* und *hKv 2.1* Kanälen dar. Aus vier solcher Kurven wurden die spannungsspezifischen Maxima ermittelt, in Leitfähigkeiten umgewandelt und die Mittelwerte errechnet. In Abbildung 3.17 wurden diese Mittelwerte zusammen mit dem mittleren Fehler und der *Boltzmannkurve* gegen die Spannung aufgetragen. Die halbmaximale Aktivierung wurde hier bei einem Potential von $+3,0 \pm 1,2$ mV erreicht.

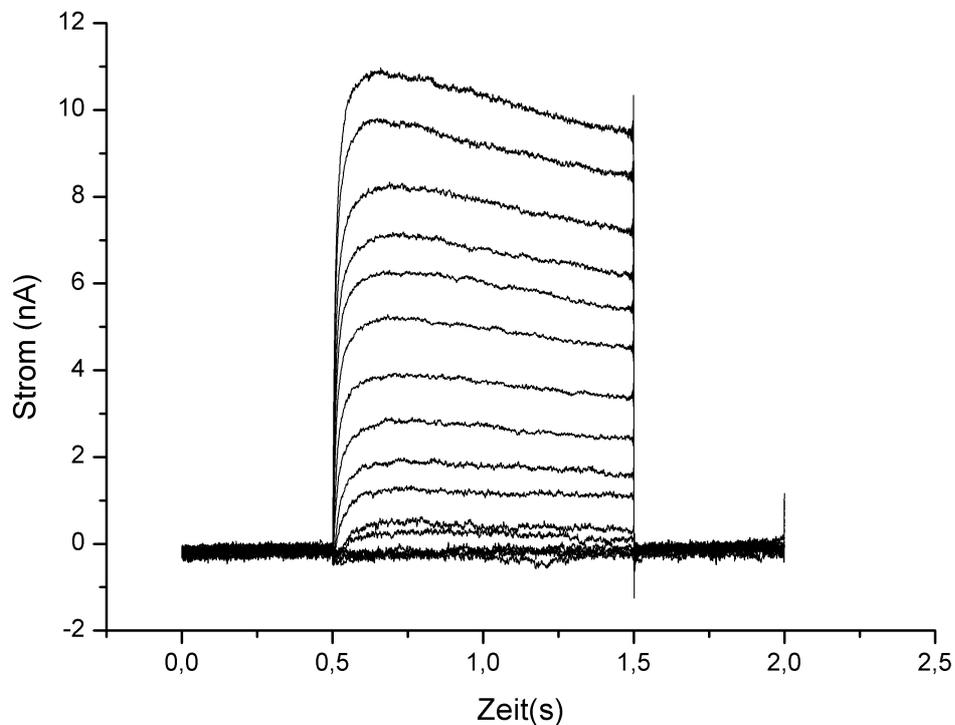


Abb. 3.16: Stromantwort von *hKv6.4-IRES-hKv2.1*-Kanälen beim Aktivierungsprotokoll in physiologischen Kaliumverhältnissen. Dargestellt ist die *whole-cell*-Ableitung einer *CHO-K1*-Zelle in *voltage-clamp*-Technik. Es zeigte sich eine spannungsabhängige Zunahme des maximalen Auswärtsstroms.

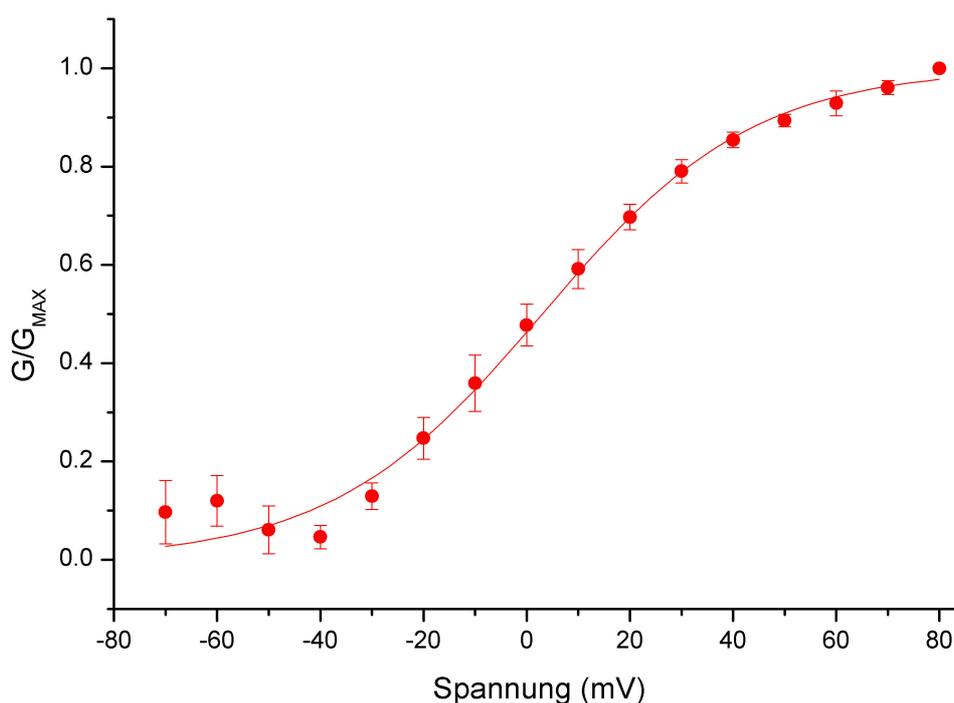


Abb. 3.17: Leitfähigkeit-Spannungs-Beziehung des *hKv6.4-IRES-hKv2.1*-Konstruktes in Badlösung mit physiologischer Kaliumkonzentration. Vier Messungen bildeten den durch Kreise repräsentierten Mittelwert und den mit senkrechten Linien dargestellten mittleren Fehler. Die Näherungskurve durch die gemittelten Messergebnisse wurde mit der Boltzmannfunktion errechnet. Das halbmaximale Aktivierungspotential betrug demzufolge $+3,0 \pm 1,2$ mV.

Ein Beispiel für das Aktivierungsverhalten des *hKv6.4-IRES-hKv2.1* Kanals in Hochkaliumlösung findet man in Abbildung 3.18. Aus den Mittelwerten von vier Messungen mit verschiedenen Zellen wurde eine *Boltzmannkurve* ermittelt und in Abbildung 3.19 dargestellt. Es ergab sich eine halbmaximale Stromantwort bei einem Potential von $-8,2 \pm 0,6$ mV.

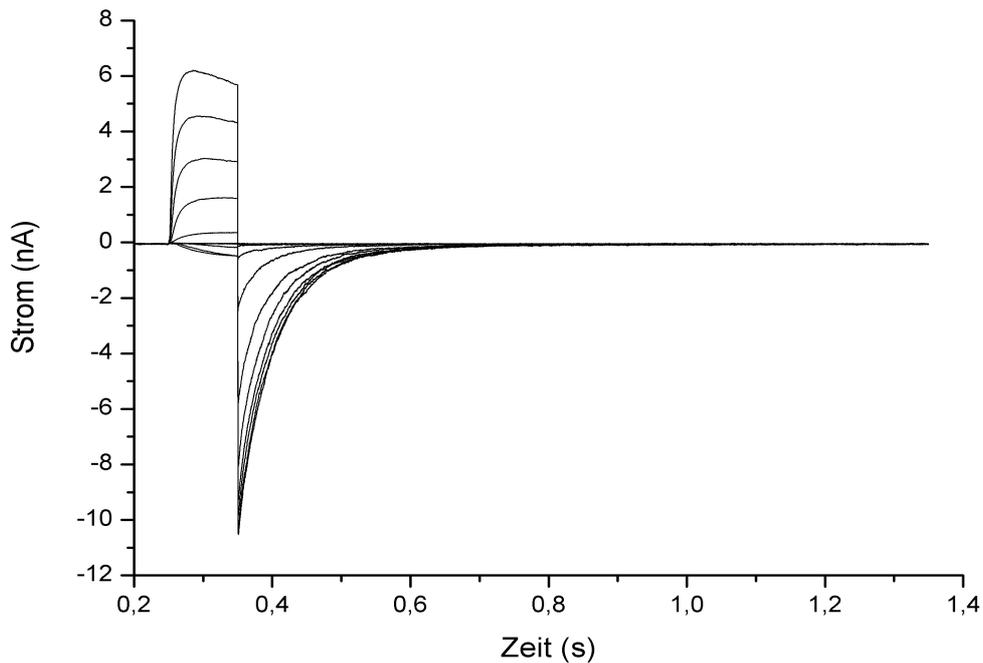


Abb. 3.18: Typische Stromantwort des *hKv6.4-IRES-hKv2.1* in Hochkaliumlösung. Die Messung wurde bei einer extrazellulären Konzentration von 130 mM mit der voltage-clamp-Methode im whole-cell-Modus erhoben.

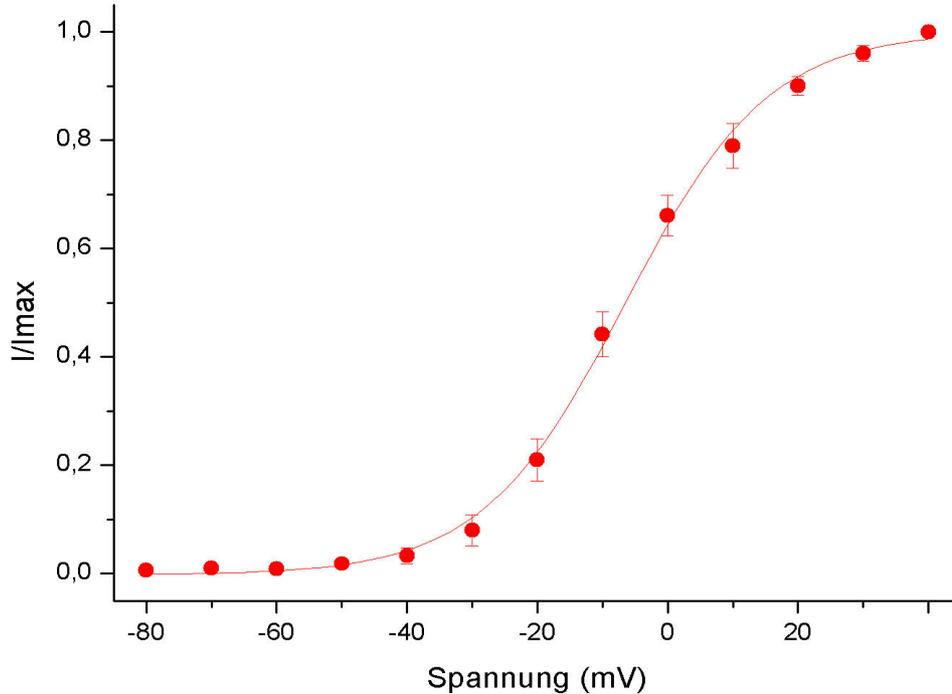


Abb. 3.20: Strom-Spannungs-Beziehung von *hKv6.4-IRES-hKv2.1* in Hochkaliumlösung. Die Mittelwerte (Kreise) und mittleren Fehler (senkrechte Linien) aus fünf Messungen wurden gegen die Spannung aufgetragen. Die entsprechende Näherungskurve wurde mit dem Boltzmannfit ermittelt. Eine Spannung von $-8,2 \pm 0,6$ mV erreichte eine halbmaximale Aktivierung. Alle Messungen wurden mit der Spannungsklemme in der Ganzzelleableitung durchgeführt.

Bei Messungen mit dem Longstep-Protokoll zeigten mit *hKv6.4-IRES-hKv2.1* transfizierte *CHO-K1*-Zellen eine Stromkinetik wie sie in Abbildung 3.21 zu sehen ist. Aus sieben verschiedenen Experimenten sind hier Mittelwert und mittlerer Fehler dargestellt. Die errechneten Zeitfaktoren betragen für den Bereich des schnellen Stromabfalls $2,7 \pm 0,2$ s und für den folgenden langsameren Anteil $13,5 \pm 1,6$ s.

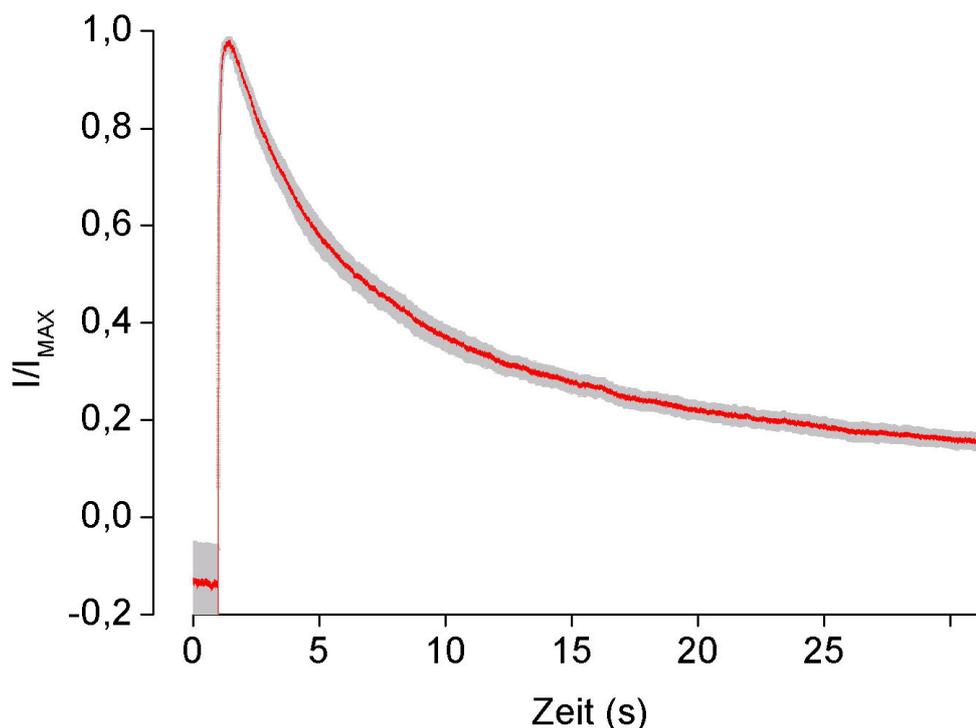


Abb. 3.21: Mittlerer Stromverlauf des *hKv6.4-IRES-hKv2.1*-Kanals beim Longstepprotokoll. Aus sieben verschiedenen Messungen ist der Mittelwert in rot samt mittlerem Fehler in grau dargestellt. Mit der Spannungsklemme wurde in der *whole-cell*-Konfiguration für 30 Sekunden ein Potential von 0 mV appliziert. Die extrazelluläre Kaliumkonzentration betrug dabei 5,4 mM.

6. hKv2.1H105V

Dieser Abschnitt stellt alle Messergebnisse vor, bei denen die Mutationsvariante *hKv2.1H105V* zum Einsatz kam. Die cDNA des *hKv2.1* wurde durch eine Mutation so verändert, dass an Position 105 des Kanalproteins statt Histidin die Aminosäure Valin eingebaut wurde. Dieser Kanal wurde danach sowohl allein als auch als IRES-Konstrukt mit *hKv6.4* in *CHO-K1*-Zellen transfiziert und untersucht.

Abbildung 3.22 zeigt die typische Stromantwort des *hKv2.1H105V* auf das Hochkaliumaktivierungsprotokoll. Trotz veränderter Aminosäuresequenz war dieses Kanalprotein also in der Lage funktionsfähige Kanäle zu bilden. In Abbildung 3.23 sind die entsprechenden Mittelwerte und mittleren Fehler aus acht unterschiedlichen Messungen sowie die *Boltzmann*-Näherungskurve dargestellt. Das halbmaximale Aktivierungspotential lag bei diesem Kanal bei $+2,3 \pm 0,8$ mV.

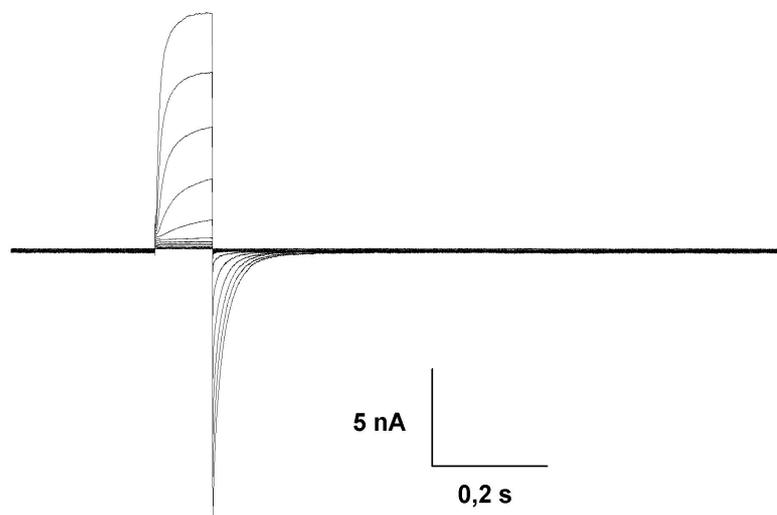


Abb. 3.22: Typische Stromantwort des *hKv2.1H105V* beim Hochkalium-Aktivierungsprotokoll. Die Messung wurde mit der Spannungsklemme im *whole-cell*-Modus bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 130 mM erhoben. Die Spannung wurde in 10 mV Stufen von -80 bis $+40$ mV erhöht und für jeweils 100 ms gehalten. Zwischen den Stufen kehrte das Potential auf das Ausgangsniveau zurück und ermöglichte einen Einwärtsstrom, den so genannten *tail-current*.

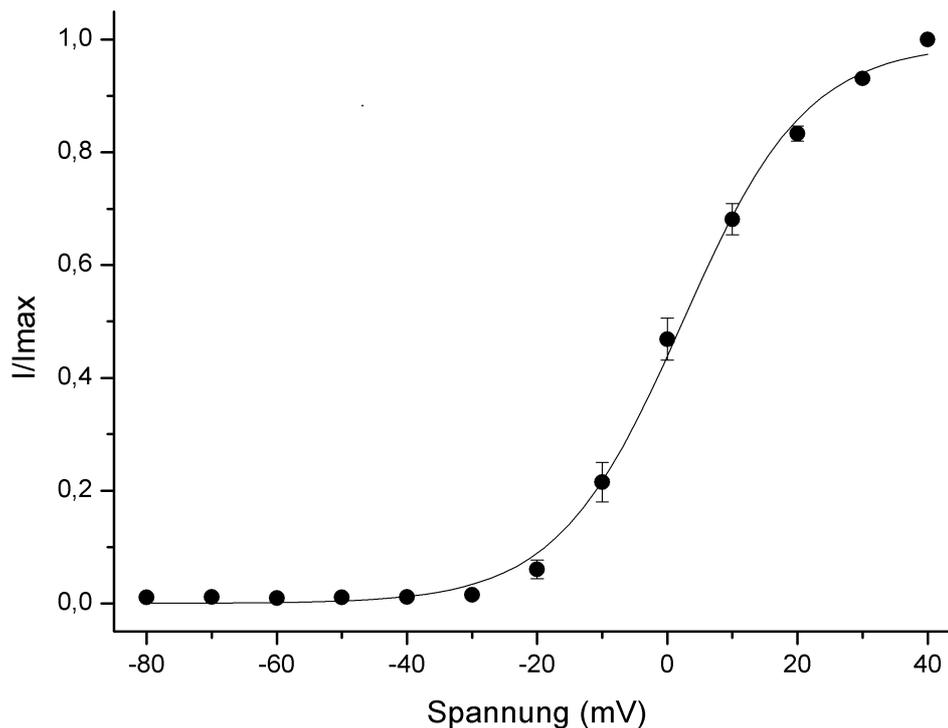


Abb. 3.23: Strom-Spannungs-Beziehung des *hKv2.1H105V*-Kanals in Hochkaliumlösung. Aus acht verschiedenen Aktivierungsmessungen sind die genormten und gemittelten *tail-current* als Kreise und die jeweiligen mittleren Fehler als senkrechte Linien dargestellt. Die sigmoidale Kinetik wurde mit der *Boltzmann*-Näherungskurve ermittelt. Das halbmaximale Aktivierungspotential lag bei $+2,3 \pm 0,8$ mV. Den Daten lagen Messungen mit der *voltage-clamp*-Methode im *whole-cell*-Modus und einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 130 mM zugrunde.

Auch mit *hKv6.4-IRES-hKv2.1H105V* transfizierte Zellen produzierten funktionsfähige Kanäle. Abbildung 3.24 veranschaulicht die klassische Stromantwort einer solchen Zelle bei Messungen mit dem Hochkalium-Aktivierungsprotokoll. Aus sieben Versuchen wurden die Mittelwerte und mittlere Fehler bestimmt und zusammen mit der *Boltzmann*kurve in Abbildung 3.25 als Strom-Spannungskurve dargestellt. Ein Potential von $+1,5 \pm 0,6$ mV erreichte bei diesem Kanal eine halbmaximale Aktivierung.

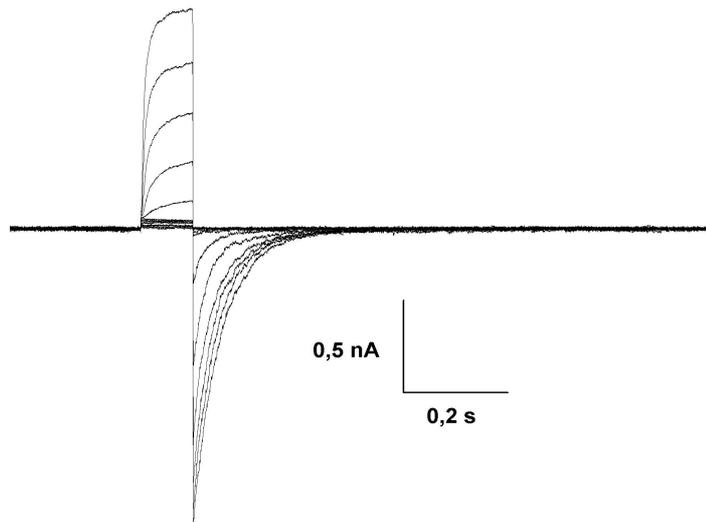


Abb. 3.24: Aktivierung von *hKv6.4-IRES-hKv2.1H105V* in Hochkaliumlösung. Das Potential wurde mit der Spannungsklemme in der Ganzzellkonfiguration nach dem Hochkalium-Aktivierungsprotokoll appliziert.

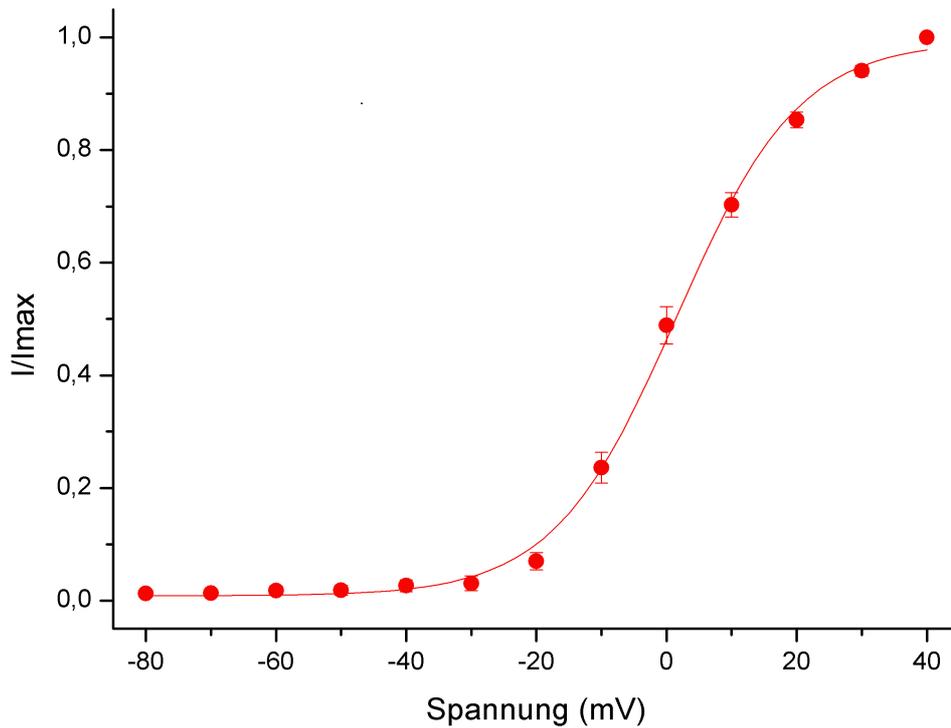


Abb. 3.25: *hKv6.4-IRES-hKv2.1H105V*, Strom-Spannungs-Beziehung in Hochkaliumlösung. Aus sieben *whole-cell*-Messungen mit der *voltage-clamp*-Methode wurden die Mittelwerte als Quadrate und die zugehörigen mittleren Fehler als senkrechte Linien aufgetragen. Die rote Kurve repräsentiert die sigmoidale Kinetik nach der *Boltzmann*gleichung. Für das halbmaximale Aktivierungspotential wurde ein Wert von $+1,5 \pm 0,6$ mV errechnet.

Diskussion

Die vorangehenden Abschnitte beschreiben die Durchführung der Experimente und enthalten die Ergebnisse der Messungen. Dabei wurden die Kanalproteine *hKv2.1*, *hKv6.1*, *hKv6.3*, *hKv6.4* und die Mutante *hKv2.1H105V* unter unterschiedlichen Bedingungen mit verschiedenen Spannungsprotokollen elektrophysiologisch untersucht. In diesem Abschnitt soll nun eine vergleichende Betrachtung mit kritischer Diskussion möglicher Schlussfolgerungen stattfinden. Es werden dazu auch Ergebnisse früherer Publikationen auf Übereinstimmung oder Differenzen mit dieser Arbeit geprüft. Abschließend soll noch kurz auf Bedeutung beziehungsweise mögliche Anwendbarkeit der Erkenntnisse und weiteren, zukünftigen Forschungsbedarf eingegangen werden.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass *CHO-K1*-Zellen, die mit *IRES*-Konstrukten aus *hKv2.1* und *hKv6*-Mitgliedern transfiziert wurden, funktionsfähige Ionenkanäle exprimierten und in die Zellmembran einbauten. Frühere Untersuchungen im Institut für Pharmakologie und Toxikologie, die in dieser Arbeit nicht aufgeführt sind, zeigten, dass bei *HEK-293*-Zellen, die jeweils nur mit *hKv6.1*-, *hKv6.3*- oder *hKv6.4*-Genen transfiziert wurden keine funktionellen Kaliumkanäle gebildet wurden. Durch konfokale Mikroskopie konnten die Kanalproteine hier intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert werden. Die Gene wurden also transkribiert und translatiert, konnten aber nicht als arbeitende Kanäle in die Membran eingebaut werden. Durch zusätzliche Transfektion von *hKv2.1*-cDNA änderte sich dieses Bild, und Vertreter sämtlicher transfizierter Familien erreichten die Zellmembran. Aufgrund des tetrameren Aufbaus der Kaliumkanäle aus vier Untereinheiten und der hohen Sequenz- und Strukturhomologie ging man daher von der Bildung von Heterotetrameren aus (Mederos et al., 2003). Bereits veröffentlichte Untersuchungen konnten nachweisen, dass durch die Kotransfektion von α -Untereinheiten mit den sogenannten γ -Proteinen neue Kanäle mit jeweils eigenen charakteristischen Eigenschaften entstehen (Kerschensteiner et al., 1999; Kramer et al., 1998; Ottschytsch et al., 2002;

Richardson et al., 2000; Sano et al., 2001; Zhu et al., 1999). Inwieweit die Mitglieder der *hKv6*-Familie die biophysikalischen Charakteristika des *hKv2.1*-Kanals modifizierten, soll nun im Folgenden heraus gearbeitet werden.

1. Aktivierung

Abbildung 4.1 zeigt die Ergebnisse der Aktivierungsuntersuchungen in physiologischen Kaliumverhältnissen im direkten Vergleich. Es handelte sich dabei um *Boltzmann*-Näherungskurven, die in üblicher Weise auf Grundlage von genormten und gemittelten Leitfähigkeiten erstellt wurden.

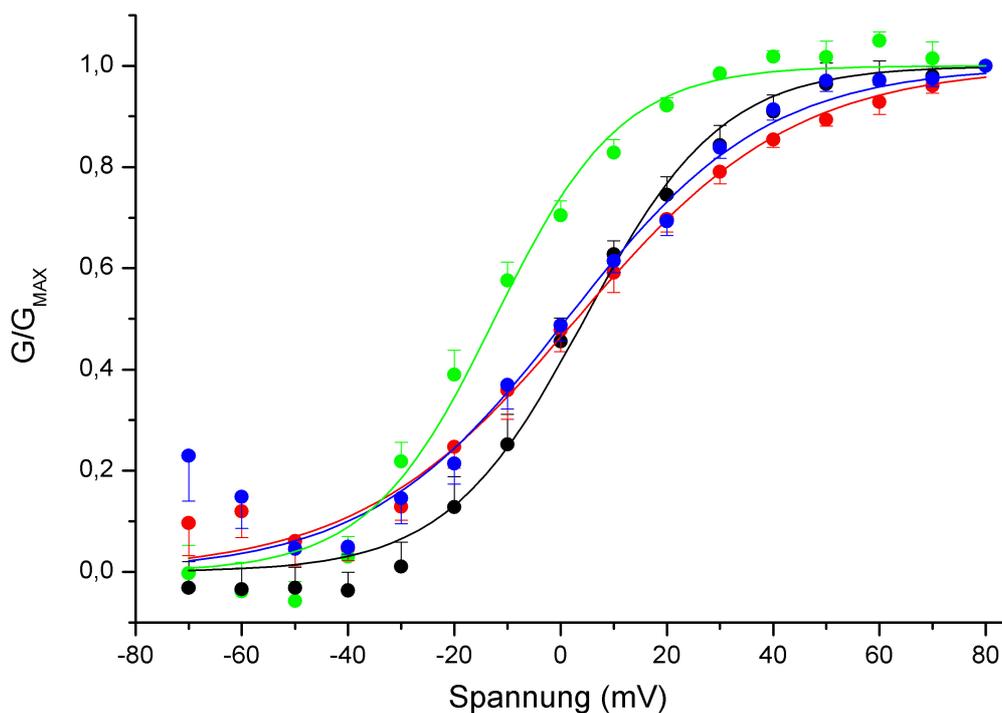


Abb. 4.1: Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen der Kanäle *hKv2.1* (schwarz), *hKv6.1-IRES-hKv2.1* (blau), *hKv6.3-IRES-hKv2.1* (grün) und *hKv6.4-IRES-hKv2.1* (rot). Die Mittelwerte der Leitfähigkeitsanteile zu jeder Spannung sind als Kreise, die mittleren Fehler jeweils als senkrechte Linien dargestellt. Die sigmoidalen Kurven repräsentieren die *Boltzmann*-Näherungen. Alle Experimente wurden bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 5,4 mM in der Ganzzelleableitung durchgeführt, wobei für *hKv2.1* fünf, für *hKv6.1-IRES-hKv2.1* vier, für *hKv6.3-IRES-hKv2.1* sechs und für *hKv6.4-IRES-hKv2.1* vier unterschiedliche Messungen erhoben wurden.

In Abbildung 4.1 wird eine deutliche Verschiebung des *hKv6.3-IRES-hKv2.1* gegenüber den anderen Kanälen in Richtung negativer Potentialbereiche erkennbar. Dies spiegelte sich auch in der Spannung wider, die eine halbmaximale Stromantwort bewirkte. Die halbmaximalen Aktivierungspotentiale von *hKv2.1* mit +4,5 mV, von *hKv6.1-IRES-hKv2.1* mit +1,2 mV und von *hKv6.4-IRES-hKv2.1* mit +3,0 mV bewegten sich im selben Spannungsbereich. Dahingegen fand die halbmaximale Aktivierung des *hKv6.3-IRES-hKv2.1*-Konstruktes mit -12,4 mV schon auf deutlich niedrigerem Potentialniveau statt. Tabelle 4.1 zeigt diese Werte im Überblick.

KANAL	Pot _{50%} (mV)
<i>hKv2.1</i>	+4,5 ± 1,0
<i>hKv6.1-IRES-hKv2.1</i>	+1,2 ± 2,3
<i>hKv6.3-IRES-hKv2.1</i>	-12,4 ± 1,2
<i>hKv6.4-IRES-hKv2.1</i>	+3,0 ± 1,2

Tab. 4.1: Halbmaximales Aktivierungspotential (Pot_{50%} in mV) der verschiedenen Kanäle in physiologischem Kaliummilieu. Die Werte wurden mit Hilfe der *Boltzmannfunktion* ermittelt. Es lagen dazu Mittelwerte aus fünf Messungen mit *hKv2.1*, aus vier Messungen mit *hKv6.1-IRES-hKv2.1*, sechs Messungen mit *hKv6.3-IRES-hKv2.1* und aus vier Messungen mit *hKv6.4-IRES-hKv2.1* vor. Sie beziehen sich auf Experimente in Ganzzelleableitung mit Spannungsklemmtechnik.

Die Kurven von *hKv6.1-IRES-hKv2.1* und *hKv6.4-IRES-hKv2.1* zeigten einen sehr ähnlichen Verlauf. Im Vergleich zum *hKv2.1*-Kanal erschien die sigmoidale Kinetik jedoch abgeflacht und geglättet, was als Ausdruck einer geringeren Empfindlichkeit der Kanäle für Spannungsänderungen gilt. Diesen Effekt konnten *Ottschytsch et al.* 2002 bei Kotransfektion von *hKv6.4* ebenfalls beobachten. Es zeigte sich auch hier eine Abflachung der Boltzmannkurve mit einem höheren *slope*-Faktor als beim *hKv2.1*-Wildtyp.

Die weiteren Ergebnisse unterscheiden sich jedoch von früheren Untersuchungen mit *hKv6.3* und *hKv6.4*. *Ottschytsch et al.* konnten 2002 keinen Einfluss von *hKv6.3*-Proteinen auf das Aktivierungsverhalten von *hKv2.1* nachweisen, erhielten aber durch *hKv6.4* eine Verschiebung der

Aktivierungskinetik in Richtung negativer Potentiale mit einer negativeren halbmaximalen Aktivierungsspannung. Die unterschiedlichen Resultate könnten durch die Verwendung verschiedener Transfektionsmethoden und Zelllinien verursacht sein. Zudem verwendete die Arbeitsgruppe um *Ottschytsch* keine einheitlichen Spannungsprotokolle für *hKv2.1* und *hKv6.4*, was die Bewertung der resultierenden Stromkurven durch direkten Vergleich nur eingeschränkt zulässt. Zu beachten ist hierbei die differente Nomenklatur. *Ottschytsch* bezeichnete *hKv6.3* noch als *hKv10.1* während *hKv6.4* noch *hKv6.3* genannt wurde.

Die Versuchsergebnisse der Hochkaliumexperimente dieser Arbeit bestätigten die linksverschiebende Wirkung des *hKv6.3*-Proteins. So zeigte sich im direkten Vergleich, wenn auch weniger ausgeprägt als in physiologischen Kaliumverhältnissen ebenfalls eine Parallelverschiebung der *hKv6.3-IRES-hKv2.1*-Kinetik in Richtung negativer Potentiale. In Abbildung 4.2 sind die verschiedenen Kurven nebeneinander aufgetragen.

Die *hKv6.1*- und *hKv6.4*-Konstrukte wiesen wieder eine Abflachung der sigmoidalen Kinetik auf. Anders als bei oben angeführten Ergebnissen in physiologischen Kaliumverhältnissen nahmen die beiden Kurven jedoch getrennte, unterschiedliche Verläufe. Zudem bewegte sich das halbmaximale Aktivierungspotential von *hKv6.1-IRES-hKv2.1* im gleichen Bereich wie der linksversetzte *hKv6.3-IRES-hKv2.1*. Tabelle 4.2 enthält alle halbmaximalen Aktivierungswerte der Hochkaliummessungen.

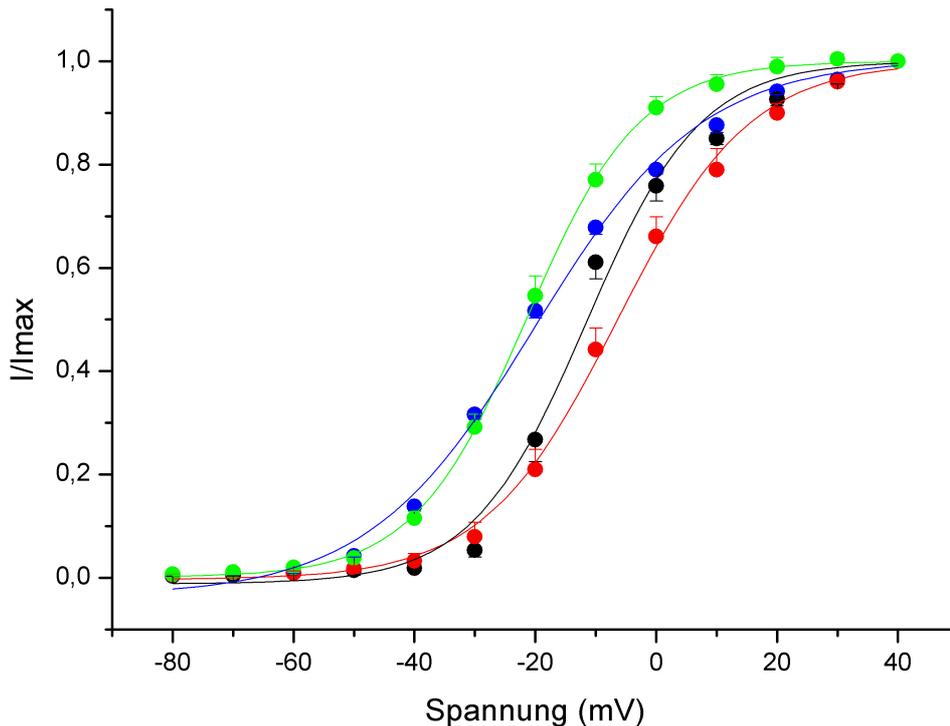


Abb. 4.2: Strom-Spannungs-Beziehungen der Kanäle *hKv2.1* (schwarz), *hKv6.1-IRES-hKv2.1* (blau), *hKv6.3-IRES-hKv2.1* (grün) und *hKv6.4-IRES-hKv2.1* (rot) in Hochkaliumlösung. Dabei wurden die Mittelwerte (Kreise) der maximalen *tail-currents* aus mehreren unabhängigen Messungen gebildet, auf den maximalen Einwärtstrom normiert und mit mittlerem Fehler (senkrechte Linien) gegen die Spannung aufgetragen. Daraus konnte dann mit Hilfe der *Boltzmannfunktion* die sigmoidale Kinetik als Näherungskurve ermittelt werden. Sämtliche Messungen wurden mit der *voltage-clamp*-Methode in der *whole-cell*-Konfiguration und in einer Badlösung mit einer Kaliumkonzentration von 130 mM durchgeführt. Die grüne Kurve des *hKv6.3-IRES-hKv2.1* zeigt den frühesten Anstieg des Stromanteils und zeigt eher als die anderen Kanäle eine Sättigungskinetik. Das halbmaximale Aktivierungspotential lag dementsprechend weit im negativen Bereich.

KANAL	Pot _{50%} (mV)
<i>hKv2.1</i>	-12,5 ± 1,2
<i>hKv6.1-IRES-hKv2.1</i>	-20,0 ± 0,9
<i>hKv6.3-IRES-hKv2.1</i>	-21,0 ± 0,3
<i>hKv6.4-IRES-hKv2.1</i>	-8,2 ± 0,6

Tab. 4.2: Halbmaximales Aktivierungspotential (Pot_{50%} in mV) mit Standardabweichung der verschiedenen Kanäle in Hochkaliumlösung. Die Werte wurden mit Hilfe der *Boltzmannfunktion* ermittelt. Es lagen dazu Mittelwerte aus fünf Messungen mit *hKv2.1*, aus vier Messungen mit *hKv6.1-IRES-hKv2.1*, aus fünf Messungen mit *hKv6.3-IRES-hKv2.1* und aus vier Messungen mit *hKv6.4-IRES-hKv2.1* vor. Sie beziehen sich auf *voltage-clamp*-Experimente mit *whole-cell*-Ableitung in einem Hochkaliummilieu mit einer intra- und extrazellulären Konzentration von je 130 mM.

Die Messungen wiesen also prinzipiell die gleiche Tendenz bei der modifizierenden Wirkung der γ -Proteine auf, jedoch mit unterschiedlicher Ausprägung. So war der linksverschiebende Effekt des *hK6.3* in physiologischen Kaliumverhältnissen mit einer Verschiebung von -17 mV ausgeprägter als in Hochkaliumlösung mit nur -9 mV. Die Differenzen beim *hKv6.4-IRES-hKv2.1* waren noch prägnanter. In Hochkaliumlösung zeigte sich, ähnlich wie von *Ottshytsch* beschrieben ebenfalls eine frühere, negativere halbmaximale Aktivierungsspannung. Dieser Effekt war in physiologischer Kaliumlösung nicht nach zu weisen. Ebenfalls different zeigte sich der Vergleich von *hKv6.4* mit *hKv6.1*. Während die Kurvenverläufe bei physiologischen Verhältnissen fast deckungsgleich waren, boten sie in Hochkaliumlösung einen parallel verschobenen Verlauf.

Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede könnte in einem mathematisch bedingten Abweichungseffekt liegen. Die Errechnung der Leitfähigkeit mit der Formel

$$G = I / U - E_k$$

wobei **G** die Leitfähigkeit,
I der gemessene Strom,
U die angelegte Spannung und
E_k das errechnete Gleichgewichtspotential waren,

wurde bei Spannungsbereichen, die sich dem Kaliumgleichgewichtspotential annäherten, stark vom Rausch- und Leckstrom beeinflusst und verfälscht. Wurden angelegtes Membranpotential U und Gleichgewichtspotential E_k immer ähnlicher, nahm die Differenz im Nenner immer kleinere Werte an. Die Leitfähigkeit wurde also fast nur noch durch den Stromfluss determiniert. Da sich in diesem Spannungsbereich definitionsgemäß die treibende Kraft für Kalium ebenfalls Null annäherte und der Ionenfluss durch die Kanäle dementsprechend reduziert wurde, bestand der gemessene Strom zu immer größeren Anteilen aus Rausch- beziehungsweise Leckstrom. Folgerichtig war die errechnete Leitfähigkeit bei Spannungen ähnlich des Gleichgewichtspotentials für Kalium von -81,7 mV deutlich vom Leckstrom

beeinflusst, was sich bei den Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen als zunehmender mittlerer Fehler ausdrückte. Da diese Werte Grundlage für die sigmoidale Näherungskinetik waren, wirkte sich die Fehlerquote konsekutiv auch beim *Boltzmannfit* aus und könnte zu Verschiebungen geführt haben.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle lag im Zeitpunkt der *tail-current*-Bestimmung. Optimalerweise sollte der repolarisierende Spannungssprung beim maximalen Stromfluss erfolgen, da hier die meisten Kanäle geöffnet waren. Nach den 100 ms des verwendeten Aktivierungsprotokolls nahm jedoch bei manchen Spannungen der Strom noch zu, während gerade bei höheren Potentialen der Ionenfluss bereits wieder reduziert wurde. Die gemessenen *tail-current*-Werte waren also durch diesen methodisch bedingten Fehler beeinflusst. Bei kritischer Betrachtung der Stromkurven erscheint der verfälschende Effekt jedoch nicht sehr ausgeprägt.

Sano et al. untersuchten 2001 als erste das *hKv6.3*-Protein und konnten ähnlich wie *Otschytsch* (2002) keine signifikante Beeinflussung des Aktivierungsverhaltens bei Kotransfektion mit *hKv2.1* feststellen. Die Arbeitsgruppe zeigte lediglich Modifikationen bei der Deaktivierung. Die Vergleichbarkeit könnte durch differente Zelllinien und Transfektionsmethoden aber eingeschränkt sein. So wurde von *Sano et al.* mit einer Zellreihe gearbeitet, die stabil *hKv2.1*-Proteine exprimiert. Die *hKv6.3*-Gene wurden zusätzlich transfiziert. Die Rate der Heteromultimere war bei dieser Versuchsanordnung jedoch je nach Erfolg der transienten Transfektion und Transfektionsdauer variabel. Die Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit der abgeleiteten Ergebnisse ist daher eingeschränkt. Eine Beeinflussung des elektrophysiologischen Verhaltens von *hKv2.1* durch die *hKv6*-Familie wird aber durch alle vorliegenden Arbeiten bestätigt. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation lassen sich folgende Aspekte ableiten:

- 1.) *hKv6.3* verschiebt die Aktivierungskinetik von *hKv2.1* in Richtung negativer Potentiale und
- 2.) *hKv6.1* und *hKv6.4* bewirken eine Abflachung der Aktivierungskinetik von *hKv2.1*.

2. Inaktivierung

Zur Beschreibung der Inaktivierungskinetik wurden Messungen mit dem *Longstep*protokoll durchgeführt. Man aktivierte die Kanalproteine mit einem Spannungssprung von -80 auf 0 mV und hielt dieses Potential für eine Dauer von 30 Sekunden. Abbildung 4.3 zeigt die Mittelwerte mit mittlerem Fehler der verschiedenen Kanäle. Bei der vergleichenden Betrachtung fiel ein gemeinsames Muster auf. Bei allen vier Kanälen folgten dem Strommaximum erst ein schneller Stromabfall und dann eine langsamere Inaktivierungskinetik. Anschließend folgte erwartungsgemäß der Übergang in einen exponentiell abnehmenden Kurvenverlauf. Nach dem Modell der C-, O- und I-Kanalkonformationen wie es in der Einleitung beschrieben ist, bedeutete dies, dass die Ionenporen beim Spannungssprung vom C- zum O-Zustand wechselten und der maximale Auswärtsstrom produziert wurde. Anschließend erfolgte die sukzessive Inaktivierung mit einem zunächst schnellen und dann langsameren Übergang in die nicht leitende, nicht aktivierbare I-Konformation und der Stromfluss nahm wieder ab. Nach einer gewissen Zeit wurde jedoch ein Stromniveau erreicht, das nicht mehr weiter reduziert wurde. Eine komplette Inaktivierung fand also nicht statt und ein gewisser Anteil der Ionenkanäle verblieb weiterhin aktiviert und leitend. Zusätzlich konnte sich ein weiterer Anteil auch bei hohen Potentialen zum aktivierbaren Zustand regenerieren und gleich wieder aktiviert werden. Der Stromfluss befand sich daher auf höherem Niveau als beim niedrigeren Ausgangspotential. Diese Spannungsabhängigkeit des Gleichgewichts zwischen geschlossen-aktivierbaren, aktivierten und inaktivierten Kanalkonformationen zeigte sich beim exponentiell abnehmenden und asymptotischen Kurvenverlauf des *hKv2.1* sehr deutlich. Für eingehende Vergleiche dieses Phänomens waren die vorliegenden Daten jedoch nicht geeignet, insbesondere da bei *hKv6.3-IRES-hKv2.1* nach den dreißig Sekunden des *Longstep*protokolls noch immer eine Stromabnahme zu beobachten war. Es zeichnete sich jedoch ab, dass die *hKv6*-Proteine in unterschiedlichem Maße das Kanalkonformationsgleichgewicht in Richtung höherer Stromproduktion verschoben. So produzierte *hKv6.4-IRES-hKv2.1* nach 30

Sekunden Messdauer einen fast doppelt so hohen Stromanteil wie der homotetramere *hKv2.1*-Kanal.

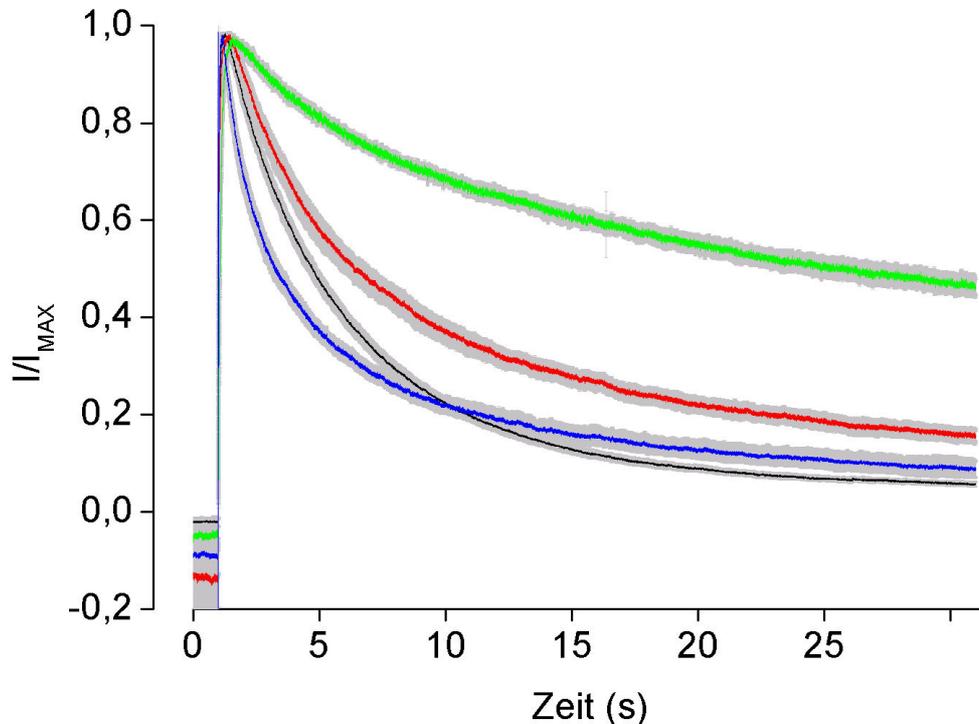


Abb. 4.3: Untersuchungsergebnisse der Longstepexperimente im Vergleich. Der mittlere Stromverlauf von neun Experimenten mit *hKv2.1* ist in schwarz, von sieben *hKv6.1-IRES-hKv2.1*-Messungen in blau, von sechs Untersuchungen mit *hKv6.3-IRES-hKv2.1* in grün und von sieben Messungen mit *hKv6.4-IRES-hKv2.1* in rot dargestellt. Der jeweilige mittlere Fehler wird durch die grauen Bereiche repräsentiert. Alle Kanäle wurden in physiologischen Kaliumverhältnissen mit der Spannungsklemme in der Ganzzelle für 30 Sekunden einem Potential von 0 mV ausgesetzt. Die Kurven erreichten zunächst gemeinsam den Maximalstrom und zeigten beim frühen Inaktivierungsabschnitt Ähnlichkeiten. Die anschließenden Kurvenabschnitte unterschieden sich aber deutlich. Der Kanal *hKv6.1-IRES-hKv2.1* zeigte initial den schnellsten Stromabfall, wurde aber im Verlauf der späten Inaktivierungskinetik von *hKv2.1* gekreuzt, der bei Messende nur noch 10 Prozent des Maximalstromes produzierte. Das Kanalprotein von *hKv6.3-IRES-hKv2.1* zeigte eine relativ flache Inaktivierungskinetik und lieferte nach 30 Sekunden Daueraktivierung noch einen Stromanteil von 50 Prozent. Die Kurve des *hKv6.4-IRES-hKv2.1* nahm eine Mittelstellung ein.

Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wären sogenannte *steady-state*-Inaktivierungsuntersuchungen hilfreich. Dabei würden ausgehend von unterschiedlichen Membranpotentialen, die für relativ lange Zeit gehalten werden, Depolarisationssprünge auf ein fixes Spannungsniveau erfolgen. Die resultierenden Stromantworten deckten den Anteil der aktivierbaren Ionenkanäle in Abhängigkeit vom angelegten Membranpotential auf und

ermöglichten damit Rückschlüsse auf die Fraktion der Kanalproteine in inaktiviertem Konformationszustand. *Ottshytsch et al.* führten 2002 derartige Messungen mit *hKv6.3* und *hKv6.4* durch. Es zeigte sich hierbei keine Beeinflussung des Inaktivierungsverhaltens von *hKv2.1* bei Kotransfektion mit *hKv6.3* jedoch eine deutliche Verlagerung der Inaktivierungskinetik in Richtung negativer Potentiale durch *hKv6.4*-Proteine. Leider lassen sich diese Ergebnisse bei Verwendung unterschiedlicher Zellen, Transfektionsmethoden und Kaliumkonzentrationen nicht auf die Ergebnisse dieser Arbeit übertragen.

Die weiteren Überlegungen konzentrierten sich auf den frühen und mittleren Kurvenverlauf. Der Maximalstrom wurde von allen Kanälen zeitgleich erreicht, sodass sich hier ein gemeinsamer Startpunkt für Inaktivierungsvergleiche befand. Für den folgenden Stromabfall suchte man geeignete Näherungskurven, die die Kinetik einfach aber dennoch zutreffend widerspiegeln. Es stellte sich heraus, dass sich das Inaktivierungsverhalten aus zwei exponentiellen Funktionen zusammensetzte. Die Charakterisierung der unterschiedlichen Anteile der Inaktivierung konnte dann unkompliziert mit den zwei Zeitfaktoren erfolgen, welche den jeweils exponentiellen Stromabfall im frühen und späten Kurvenverlauf beschrieben. Die Zeitkonstanten für die schnelle Inaktivierungskinetik τ_1 und für den langsameren Anteil τ_2 sind für die verschiedenen Kanäle in Tabelle 4.3 angegeben und in Abbildung 4.4 graphisch dargestellt. Wie aus Tabelle 4.3 ersichtlich, befanden sich die Zeitfaktoren τ_1 bei *hKv2.1*, *hKv6.3-IRES-hKv2.1* und *hKv6.4-IRES-hKv2.1* mit Werten von 2,7 s und 2,8 s im gleichen Bereich. Das *hKv6.1-IRES-hKv2.1* Konstrukt zeigte mit 1,8 s einen etwas schnelleren Stromabfall. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Der erste Abschnitt des *Longstep*protokolls folgte bei diesen Kanälen anscheinend der gleichen Kinetik.

KANAL	τ_1 (s)	τ_2 (s)
<i>hKv2.1</i>	2,8 ± 0,6	7,2 ± 0,6

<i>hKv6.1-IRE5-hKv2.1</i>	1,8 ± 0,2	10,2 ± 0,6
<i>hKv6.3-IRE5-hKv2.1</i>	2,8 ± 0,3	21,6 ± 1,0
<i>hKv6.4-IRE5-hKv2.1</i>	2,7 ± 0,2	13,5 ± 1,6

Tab. 4.3: Zeitfaktoren mit Standardabweichung für die Inaktivierungskinetik der einzelnen Kanäle. Während sich τ_1 für den frühen Abschnitt bei den vier Kanalproteinen im selben Bereich bewegte, fand man bei τ_2 für den folgenden Bereich deutliche Unterschiede. Die Werte wurden aus *Longstep*experimenten im *whole-cell*-Modus und physiologischer Badlösung mit einer Kaliumkonzentration von 5 mM erhoben. Insgesamt neun Messungen mit *hKv2.1*, sechs Experimente mit *hKv6.1-IRE5-hKv2.1*, sechs Messungen mit *hKv6.3-IRE5-hKv2.1* und sieben Messungen mit *hKv6.4-IRE5-hKv2.1* flossen in die Berechnungen ein.

Entscheidende Unterschiede fanden sich erst im späteren Inaktivierungsanteil. Die Zeitkonstanten für den exponentiellen Stromabfall in diesem Bereich waren bei allen Kanälen deutlich verschieden. Anscheinend nahmen die *hKv6*-Proteine großen Einfluss auf das Schließungsverhalten des *hKv2.1*-Kanalproteins. Es resultierte eine langsamere Inaktivierungskinetik und führte vermutlich zu einer Zunahme der basalen Stromproduktion bei steigenden Potentialen. Den deutlichsten Effekt hatte dabei *hKv6.3*.

Eine Erklärung für das zweigeteilte Inaktivierungsverhalten könnte die Annahme zweier voneinander unabhängiger Mechanismen liefern. Die frühe, schnelle Kinetik könnte größtenteils unabhängig von γ -Untereinheiten reguliert werden und daher bei allen Kanaltypen einen fast identischen Verlauf zeigen während der zweite Anteil stark durch heteromeren Aufbau des Kanalproteins beeinflusst wird. Denkbar sind hier ein N-terminal vermittelter *ball-and-gate*-Mechanismus oder zwei getrennt regulierte Inaktivierungsmechanismen vom C-Typ. Diese Beobachtung wurde bislang noch von keiner veröffentlichten Arbeit untersucht und zeigt den weiteren Forschungsbedarf.

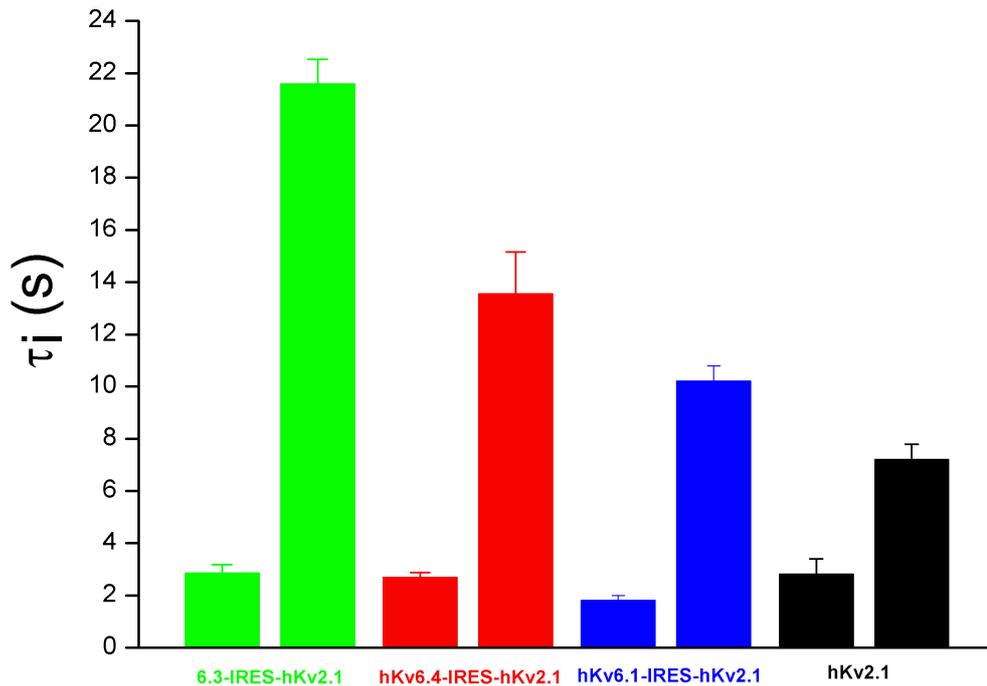


Abb. 4.4: Zeitkonstanten mit mittlerem Fehlerbalken für die Inaktivierung der vier Kaliumkanäle als Balkendiagramm. *hKv2.1* ist in schwarz, *hKv6.1-IRES-hKv2.1* in blau, *hKv6.4-IRES-hKv2.1* in rot und *hKv6.3-IRES-hKv2.1* in grün dargestellt. Der jeweils linke Balken repräsentiert τ_1 der frühen Inaktivierungskinetik während τ_2 der späten Inaktivierungskinetik durch den rechten Balken symbolisiert wird. Die Daten stammten aus *Longstep*messungen in physiologischer Kaliumlösung, die durch die *voltage-clamp*-Methode im Ganzzellmodus erhoben wurden.

Zum Einfluss von *hKv6.3* und *hKv6.4* auf das Deaktivierungsverhalten von *hKv2.1* wurden zwei Analysen veröffentlicht. 2001 beobachteten *Sano et al.* eine Reduktion der Deaktivierungsgeschwindigkeit durch *hKv6.3*. Ähnliche Untersuchungen führten auch *Ottschytsch et al.* (2002) durch, kamen aber zu anderen Ergebnissen. *hKv6.3* hatte bei dieser Arbeitsgruppe keinen Einfluss auf die Deaktivierung während *hKv6.4* zu einer deutlichen Verlangsamung führte. Gezielte Deaktivierungsversuche wurden in der vorliegenden Dissertation zwar nicht durchgeführt, jedoch konnte man bei der vergleichenden Betrachtung der *tail-currents* deutliche Unterschiede im zeitlichen Ablauf der Deaktivierung erkennen. So fand man bei den heterologen Kanälen eine Verzögerung der Stromreduktion in unterschiedlichem Ausmaß. Dabei zeigte ähnlich wie beim Inaktivierungsprotokoll *hKv6.3* die größte Auswirkung.

Zusammenfassend zeichnete sich folgendes Bild ab:

- 1.) *hKv6.1*, *hKv6.3* und *hKv6.4* haben eine ausgeprägte modifizierende Wirkung auf das Inaktivierungs- und Deaktivierungsverhalten von *hKv2.1*.
- 2.) *hKv6*-Proteine senken dabei die Geschwindigkeit der Inaktivierung und Deaktivierung von *hKv2.1*.
- 3.) Die Inaktivierungskinetik ist zweigeteilt, nur die langsame Inaktivierung wird durch die *hKv6*-Proteine beeinflusst, die schnelle Komponente wird unabhängig reguliert.
- 4.) Vermutlich resultiert daraus eine höhere basale Aktivität der Ionenkanäle.

3. hKv2.1H105V

Die Ergebnisse der Experimente mit der durch Punktmutation gentechnisch veränderten cDNA *hKv2.1H105V* sollen nun vergleichend betrachtet werden. *CHO-K1*-Zellen, die mit diesen Genen transfiziert wurden, zeigten durch die ableitbare Stromantwort das Vorhandensein von Kaliumkanälen in der Membran. Die Punktmutation stand der Assemblierung und Bildung funktionsfähiger Tetramere also nicht im Wege. Auch bei Transfektion des *hKv6.4-IRES-hKv2.1H105V* zeigte sich eine typische Stromantwort. Nach Erfassung der Maxima, Normierung und Mittelwertbildung sowie Anpassung einer *Boltzmann*-Näherungskurve ließen sich die Kinetiken der beiden Kanäle in Abbildung 4.5 zusammen auftragen. Tabelle 4.4 enthält dazu die jeweiligen halbmaximalen Aktivierungspotentiale.

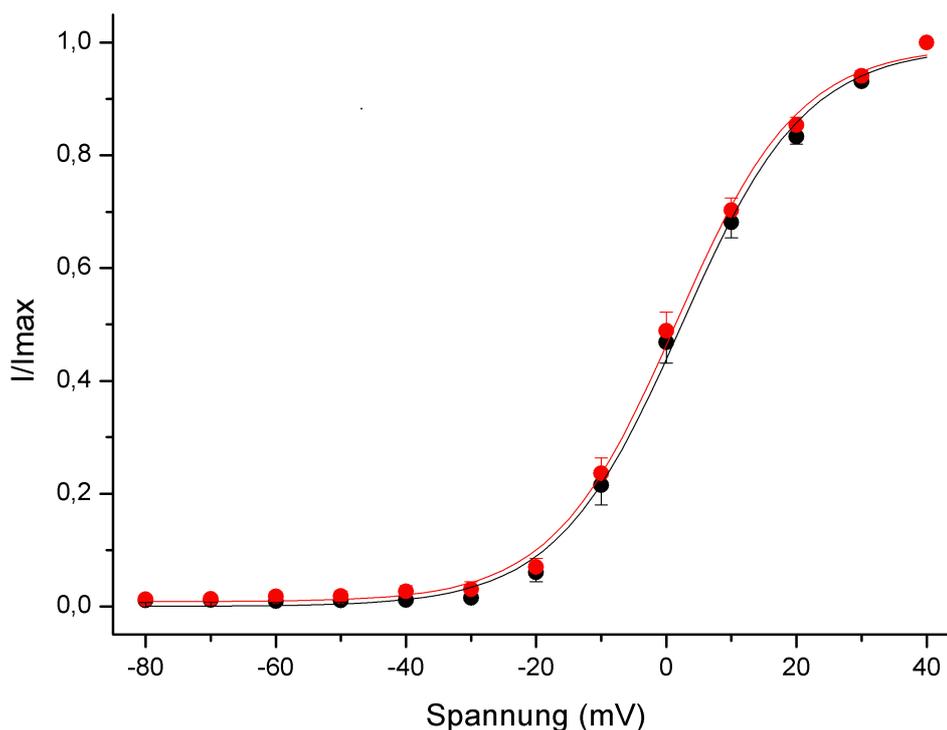


Abb. 4.5: Strom-Spannungs-Beziehungen der beiden Kanäle *hKv2.1H105V* und *hKv6.4-IRES-hKv2.1H105V* im Vergleich. Die Mittelwerte der acht (*hKv2.1H105V* in schwarz) bzw. sieben (*hKv6.4-IRES-hKv2.1H105V* in rot) verschiedenen Messungen wurden dabei als Kreise, die mittleren Fehler als senkrechte Linien und die *Boltzmann*-Näherungskurven als sigmoidale Kinetik gegen die Spannung aufgetragen. Alle Experimente wurden mit der Spannungsklemme in der Ganzzelleableitung und einer Hochkaliumlösung mit einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 130 mM durchgeführt. Man erkennt einen fast deckungsgleichen Verlauf der beiden Kurven. Dementsprechend unterschieden sich die halbmaximalen

Aktivierungspotentiale mit +2,3 mV für *hKv2.1H105V* und +1,5 mV für *hKv6.4-IRES-hKv2.1H105V* nur minimal.

KANAL	Pot _{50%} (mV)
<i>hKv2.1H105V</i>	+2,3 ± 0,8
<i>hKv6.4-IRES-hKv2.1H105V</i>	+1,5 ± 0,6

Tab. 4.4: Halbmaximale Aktivierungspotentiale (Pot_{50%} in mV) mit Standardabweichung von *hKv2.1H105V* und *hKv6.4-IRES-hKv2.1H105V*. Die Werte wurden mit Hilfe der Boltzmannfunktion ermittelt. Es lagen dazu Mittelwerte aus acht Messungen mit *hKv2.1H105V* und aus sieben Messungen mit *hKv6.4-IRES-hKv2.1H105V* vor. Sie beziehen sich auf *voltage-clamp*-Experimente in *whole-cell*-Ableitung in einem Hochkaliummilieu mit einer intra- und extrazellulären Konzentration von 130 mM.

Es zeigte sich ein praktisch deckungsgleiches Aktivierungsverhalten von *hKv2.1H105V*- und *hKv6.4-IRES-hKv2.1H105V*-Proteinen. Die Spannungen, die einen halbmaximalen Stromfluss bewirkten, lagen daher ebenfalls im gleichen Bereich.

Die beiden Aktivierungskinetiken wiesen anscheinend keine nennenswerten Unterschiede auf. Eine Auffälligkeit, die sich bei allen Messungen mit den beiden Kanälen fand, stützte diesen Eindruck. Die Ableitungen des *hKv2.1H105V* zeigten einen etwa zehnfach größeren Stromfluss als beim *IRES*-Konstrukt mit *hKv6.4*. Dieses Phänomen konnte durch den jeweils homomeren Aufbau der Kanäle aus *hKv2.1H105V*-Untereinheiten ohne Beteiligung der *hKv6.4*-Proteine gut erklärt werden. Im Expressionsvektor *pIRES* überstieg die Expression und Konzentration des ersten DNA-Anteils die Proteinbildung aus dem nachgeschalteten Gen um den Faktor 10. Das bedeutet, dass die zehnfach höhere Stromantwort bei Monotransfektion von *hKv2.1H105V* durch die zehnfach niedrigere Expressionsrate der *hKv2.1H105V*-Proteine aus dem *hKv6.4-IRES-hKv2.1H105V*-Konstrukt zu Stande kam. Zusammen mit der identischen Strom-Spannungs-Kurve wurde daher die Vermutung aufgestellt, dass bei beiden Ansätzen nur *hKv2.1H105V*-Homotetramere für die Strombildung verantwortlich zeichneten und *hKv6.4*-Untereinheiten sich nicht am Kanalaufbau beteiligen konnten. Da *hKv6.4*, wie oben gezeigt wurde, mit *hKv2.1* problemlos

assemblieren und Kanäle mit eigenen Charakteristika bilden konnte, musste die Punktmutation des Histidin zu Valin an Position 105 entscheidend für den Heteromultimerisierungsvorgang sein. Die Bildung von Homotetrameren wurde hingegen nicht verhindert.

Falls diese Schlussfolgerung zutrifft, bedeutet dies, dass die T1-Domäne und insbesondere die Aminosäure Histidin des $HX_5CX_{20}CC$ -Motivs für die Heteromultimerisierung essentiell ist. Bei der *Kv1*-Familie, die N-terminal nicht über ein Zinkbindungsmotiv verfügt, zeigt sich ein ähnlicher Effekt. Heteromultimerisierung ist nur mit Mitgliedern der eigenen Familie möglich. Anderen *Kv*-Klassen wie den γ -Untereinheiten fehlt anscheinend die vermittelnde Anknüpfungsmöglichkeit.

Zusätzliche Untersuchungen mit Analyse des Inaktivierungsverhaltens könnten diese Annahme weiter untermauern. Es sollten dabei vorzugsweise *hKv6.3*-Proteine beteiligt sein, die einen deutlicheren modifizierenden Effekt aufwiesen. Mittels Immunpräzipitation und -histochemie könnte man zudem Aufschluss über Lokalisierung und Assemblierung der verschiedenen Untereinheiten gewinnen.

Zusammenfassung

Diese Arbeit charakterisiert den Einfluss der Untereinheiten *hKv6.1*, *hKv6.3* und *hKv6.4* auf den spannungsabhängigen Kaliumkanal *hKv2.1* mit elektrophysiologischen Methoden. Zusätzlich wurden Untersuchungen mit der Mutationsvariante *hKv2.1H105V* durchgeführt, um Hinweise auf den Multimerisierungsmechanismus der Kanaluntereinheiten zu gewinnen. Dazu wurden die Gensequenzen mittels transienter Transfektion in *CHO-K1*-Zellen exprimiert und mit Hilfe der Spannungsklemmtechnik in der Ganzzelleableitung das Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten der Ionenkanäle in symmetrischen und physiologischen Kaliumverhältnissen bestimmt. Die Ergebnisse wurden aus jeweils mehreren unabhängigen Messungen mit den üblichen mathematischen Methoden (Normierung, Mittelwertbildung, exponentielle Näherung) als Leitfähigkeit-Spannungs- bzw. Strom-Spannungs-Kurven abgeleitet und interpretiert. Eine eigenständige elektrische Aktivität von *hKv6*-Molekülen zeigte sich nicht. Bei sämtlichen Transfektionsansätzen mit *hKv2.1* (*hKv2.1*, *hKv6.1-IRES-hKv2.1*, *hKv6.3-IRES-hKv2.1*, *hKv6.4-IRES-hKv2.1*, *hKv2.1H105V* und *hKv6.4-IRES-hKv2.1H105V*) hingegen konnten funktionsfähige Kaliumkanäle gebildet und nachgewiesen werden. Dabei entstanden bei den *IRES*-Konstrukten Ionenkanäle, die durch eigene elektrophysiologische Charakteristika ausgezeichnet waren und sich vom ursprünglichen *hKv2.1*-Kanal teils deutlich unterschieden. Die normalerweise elektrisch stummen *Kv6*-Untereinheiten konnten sich bei Kotransfektion mit *hKv2.1*-Genen also am Kanalaufbau beteiligen und Einfluss auf das biophysikalische Verhalten nehmen. So zeigte vor allem *hKv6.3-IRES-hKv2.1* mit einer Linksverschiebung der Leitfähigkeit-Spannungs- und Strom-Spannungs-Beziehung in Richtung negativer Potentiale eine ausgeprägte modifizierende Wirkung auf das Aktivierungsverhalten von *hKv2.1*. Die Untereinheiten *hKv6.1-IRES-hKv2.1* und *hKv6.4-IRES-hKv2.1* bewirkten eine Abflachung der sigmoidalen Aktivierungskinetik.

Wie die Analyse des Schließungsverhaltens der verschiedenen Konstrukte offenbarte, besaß die *hKv6*-Familie bei der Modifikation der

Inaktivierungskinetik des *hKv2.1* sogar noch größere Bedeutung. Die Geschwindigkeit des Stromabfalls wurde maßgeblich durch die *Kv6*-Untereinheiten bestimmt und wurde durch ihre Anwesenheit in unterschiedlichem Maße reduziert. Zusätzlich gab es Hinweise, dass die Deaktivierungsgeschwindigkeit verlangsamt wurde und die basale Aktivität auf ein höheres Level angehoben wurde. Andere Arbeitsgruppen, die ebenfalls *hKv6*-Proteine elektrophysiologisch untersuchten, kamen zu teils differenten Ergebnissen. Dies könnte jedoch durch die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien, Transfektionsvektoren, Kaliumverhältnisse und Spannungsprotokolle verursacht sein.

Zusammenfassend ergibt sich für die hier untersuchten Mitglieder der *hKv6*-Familie folgendes Bild:

1. Sie können keine homotetrameren Ionenkanäle bilden.
2. Zusammen mit *hKv2.1* entstehen funktionsfähige heteromere Kanalproteine.
3. Die elektrophysiologischen Eigenschaften, wie Aktivierung, Deaktivierung und Inaktivierung der Heteromere unterscheiden sich deutlich von den *hKv2.1*-Charakteristika.
4. Die Kanalvielfalt und –funktionsweise wird durch heteromultimeren Aufbau beträchtlich erweitert.
5. Zellen können sich mit diesem Mechanismus an die unterschiedlichen Anforderungen und Aufgaben in den verschiedenen Organen anpassen.
6. Die Aufgaben der *hKv6*-Familie entsprechen daher einer regulatorischen und modifizierenden Komponente.

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Erkennung und Assemblierung der einzelnen Untereinheiten eines spannungsabhängigen Kaliumkanals spezifisch über die N-terminale T1-Domäne vermittelt wird. Sie ist bei der Identifikation und Assemblierung der Untereinheiten (*Robinson et al.*, 2005) sowie bei der Bindung an zytoplasmatische Proteine beteiligt. Die Rolle der hochkonservierten Aminosäuresequenz $HX_5CX_{20}CC$ der T1-Domäne und insbesondere die Bedeutung des Histidins für die Multimerisierung wurden in dieser Arbeit näher untersucht. Experimente mit dem Kanal *hKv2.1H105V*, bei dem die Aminosäure Histidin dieser Sequenz durch Punktmutation ausgetauscht wurde, lieferten folgendes Ergebnis: Obwohl eine Tetramerisierung zum arbeitenden Kanal trotz Punktmutation möglich war, konnten sich *hKv6.4*-Untereinheiten nicht daran beteiligen. Die Stromkinetik des *hKv2.1H105V* wurde anders als beim Wildtyp *hKv2.1* durch Kotransfektion mit dem *hKv6.4*-Protein nicht verändert. Dieser Effekt konnte nicht durch die Abwesenheit von Zink verursacht sein, da alle Versuche mit physiologischen Zinkkonzentrationen durchgeführt wurden (*Jahng et al.*, 2002; *Strang et al.*, 2003). Es konnte also gezeigt werden, dass die Aminosäure Histidin im $HX_5CX_{20}CC$ -Motiv nur für die Heteromultimerisierung eine essentielle Rolle spielt, während die Bildung von homotetrameren *hKv2.1H105V*-Kanälen weiterhin möglich ist und anscheinend unabhängig von Histidin verläuft. Diese Erkenntnis war Grundlage für weitere Untersuchungen, die aber nicht Teil dieser Arbeit waren. So ließ sich auch bei Kotransfektion mit *hKv6.3* keine Heteromultimerisierung mehr nachweisen und FRET-Ansätze zeigten, dass zwischen *hKv2.1H105V* und *hKv6.4*- oder *hKv6.3*-Proteinen keine Interaktion stattfindet. Zusätzlich wurde die T1-Domäne, die bei der *hKv6*-Familie nicht über ein vollständiges $HX_5CX_{20}CC$ -Motiv verfügt, gentechnisch ebenfalls verändert. So entstand ein *hKv6.4V138H*-Mutant mit einem nun kompletten $HX_5CX_{20}CC$ -Motiv. Derart verändert gewannen die Kanalproteine die Fähigkeit zur Homotetramerisierung und Assemblierung mit *hKv6.4*-Proteinen. Die Bildung von funktionsfähigen Kaliumkanälen mit Expression in der Zellmembran blieb jedoch weiterhin aus (*Mederos et al.*, 2008). Eine mögliche Ursache könnte ein Retentionsmotiv sein, welches für *hKv6.4* nachgewiesen werden konnte und den Transport vom endoplasmatischen Retikulum zur Zellmembran

verhindert (*Ottshytsch et al.*, 2005). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen kongruent, dass der Histidinanteil im HX₅CX₂₀CC-Motiv Voraussetzung für die Beteiligung der *hKv6*-Familie am Kanalaufbau ist. Bei *hKv2.1* hingegen werden die Homotetramerisierung und Expression in die Zellmembran unabhängig von dieser Aminosäure vermittelt.

Literaturverzeichnis

Aggarwal SK, MacKinnon R (1996). Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 16(6):1169-77.

Armstrong CM (1971). Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *Journal of General Physiology* 58(4):413-37.

Armstrong CM (1975). Ionic pores, gates, and gating currents. *Quarterly Reviews of Biophysics* 7(2):179-210.

Barry DM, Nerbonne JM (1996). Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Annual Reviews of Physiology* 58:363-394.

Baukrowitz T, Yellen G (1995). Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺]: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron* 15(4):951-60.

Benndorf K, Koopmann R, Lorra C, Pongs O (1994). Gating and conductance properties of a human delayed rectifier K⁺ channel expressed in frog oocytes. *Journal of Physiology* 477:1-14.

Bernechèche S, Roux B (2003). A microscopic view of ion conduction through the K⁺ channel. *PNAS* 100:8644-8648.

Bezanilla F (2005). The voltage-sensor structure in a voltage-gated channel. *Trends of Biochemical Sciences* 30(4):166-8.

- Bixby KA, Nanao MH, Shen NV, Kreusch A, Bellamy H, Pfaffinger PJ, Choe S (1999). Zn²⁺-binding and molecular determinants of tetramerization in voltage-gated K⁺ channels. *Nature structural biology* 6(1):38-43.
- Bonnet S, Archer SL (2007). Potassium channel diversity in the pulmonary arteries and pulmonary veins: implications for regulation of the pulmonary vasculature in health and during pulmonary hypertension. *Pharmacological Therapie* 115(1):56-69.
- Borgatti R, Zucca C, Cavallini A, Ferrario M, Panzeri C, Castaldo P, Soldovieri MV, Baschiroto C, Bresolin N, Dalla Bernardina B, Tagliatela M, Bassi MT (2004). A novel mutation in KCNQ2 associated with BFNC, drug resistant epilepsy, and mental retardation. *Neurology* 63:57-65, 2004.
- Chiara MD, Monje F, Castellano A, Lopez-Barneo J (1999). A small domain in the N terminus of the regulatory alpha-subunit Kv2.3 modulates Kv2.1 potassium channel gating. *Journal of Neuroscience* 19:6865-6873.
- Choi KL, Aldrich RW, Yellen G (1991). Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88(12):5092-5.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B (1999). Molecular diversity of K⁺ channels. *Annual New York Academy of Sciences* 868:233-285.
- Cole KS (1979). Mostly membranes. *Annual Review of Physiology* 41:1-24.

- Consiglio JF, Andalib P, Korn JS (2003). Influence of pore residues on Permeation properties in the Kv2.1 potassium channel. Evidence for a selective functional interaction of K⁺ with the outer vestibule. *Journal of General Physiology* 121:111-124.
- Covarrubias M, Wei AA, Salkoff L (1991). Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K⁺ current systems. *Neuron* 7:763-773.
- Cushman SJ, Nanao MH, Jahng AW, DeRubeis D, Choe S, Pfaffinger PJ (2000). Voltage dependent activation of potassium channels is coupled to T1 domain structure. *Nature Structural Biology* 7:403-407.
- Deutsch C (2002). Potassium Channel Ontogeny. *Annual Review of Physiology* 2002 64:19-46.
- 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.
- Farokhi A (2002). Nachweis und Modellierung des Gatingmechanismus beim anomalen Tl⁺/K⁺-Molfraktionseffekt im Vergleich zu spontanen Stromänderungen in Na⁺/K⁺-Lösung. Dissertation Universität Kiel.
- Frech GC, VanDongen AM, Schuster G, Brown AM, Joho RH (1989). A novel potassium channel with delayed rectifier properties isolated from rat brain by expression cloning. *Nature* 340:642-645.
- Garofoli S, Jordan PC (2003). Modeling permeation energetics in the KcsA potassium channel. *Biophysical Journal* 84:2814-2830.

- Gulbis JM, Zhou M, Mann S, MacKinnon R (2002). Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. *Science* 289(5476):123-7.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews* 57:473-508.
- Guy HR, Seetharamulu P (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 83(2):508-12.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* 391:85-100.
- Hellwig N, Albrecht N, Harteneck C, Schultz G, Schaefer M (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *Journal of Cell Science* 118:917-928.
- Hille, B (1992). *Ionic channels of excitable membranes* (Sinauer Associates Inc., Sunderland), 3. Auflage.
- Hille B, Schwarz W (1978). Potassium channels as multi-ion single-file pores. *Journal of General Physiology* 72:409-442.
- Hodgkin AL (1976). Change and design in electrophysiology: an informal account of certain experiments on nerve carried out between 1934 and 1952. *Journal of Physiology* 263:1-21.

- Hodgkin AL, Huxley AF (1952). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *Journal of Physiology* 116: 449-472.
- Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99:7461-7466.
- Holmgren M, Smith PL, Yellen G (1997). Trapping of organic blockers by closing of voltage-dependent K⁺ channels: evidence for a trap door mechanism of activation gating. *Journal of General Physiology* 109(5):527-35.
- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 250(4980):533-8.
- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW (1991). Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* 7(4):547-56.
- Hugnot JP, Salinas M, Lesage F, Guillemare E, de Weille J, Heurteaux C, Mattei MG, Lazdunski M (1996). Kv8.1, a new neuronal potassium channel subunit with specific inhibitory properties towards Shab and Shaw channels. *EMBO Journal*. 15(13):3322-31.
- Isacoff EY, Jan YN, Jan LY (1991). Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K⁺ channel. *Nature* 353(6339):86-90.
- Jan LY, Jan YN (1997). Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *Journal of Physiology* 505(Pt 2):267-282.

- Jahng AW, Strang C, Kaiser D, Pollard T, Pfaffinger P, Choe S (2002). Zinc mediates assembly of the T1 domain of the voltage-gated K channel 4.2. *Journal of Biological Chemistry* 277:47885-47890.
- Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R (2003). The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423(6935):42-8.
- Ju M, Stevens L, Leadbitter E, Wray D (2003). The roles of N- and C-terminal determinants in the activation of the Kv2.1 potassium channel. *Journal of Biological Chemistry* 278(15):12769-12778.
- Kerschensteiner D, Soto F, Stocker M (2005). Fluorescence measurements reveal stoichiometry of K⁺ channels formed by modulatory and delayed rectifier alpha-subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102:6160-6165.
- Kerschensteiner D, Stocker M (1999). Heteromeric assembly of Kv2.1 with Kv9.3: effect on the state of inactivation. *Biophysical Journal* 77:248-257.
- Khanna R, Lee EJ, Papazian DM (2004). Transient calnexin interaction confers long-term stability on folded K⁺ channel protein in the ER. *Journal of Cell Science* 117:2897-2908.
- Klemic KG, Shieh CC, Kirsch GE, Jones SW (1998). Inactivation of Kv2.1 potassium channels. *Biophysical Journal* 74:1779-1789.
- Kramer JW, Post MA, Brown AM, Kirsch GE (1998). Modulation of potassium channel gating by coexpression of Kv2.1 with regulatory Kv5.1 or Kv6.1 α -subunits. *American Physiological Society* C1501-1510.

- Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lutjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C, Jentsch TJ (1999). KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96:437-446, 1999.
- Li M, Jan YN, Jan LY (1992). Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* 257:1225-1230.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309:897-903.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R (2005). Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309:903-8.
- Lopez-Barneo J, Hoshi T, Heinemann SH, Aldrich RW (1993). Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors Channels* 1(1):61-71.
- Lu J, Robinson JM, Edwards D, Deutsch C (2001). T1-T1 interactions occur in ER membranes while nascent Kv peptides are still attached to ribosomes. *Biochemistry* 40(37):10934-46.
- Manganas LN, Trimmer JS (2004). Calnexin regulates mammalian Kv1 channel trafficking. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322:577-584.
- Mederos y Schnitzler M (2001). ATP-sensitive Kaliumkanäle in Kapillarfragmenten aus dem Herzen des Meerschweinchens. Dissertation Universität Marburg.

- Mederos y Schnitzler M, Preisig-Müller R, Skrobek L, Derst C, Gudermann T, Daut J (2003). Functional analysis of Kv6.3 and Kv6.4, two novel subunits of voltage-activated potassium channels. Abstract.
- Milligan CJ, Wray D (2000). Local movement in the S2 region of the voltage-gated potassium channel hKv2.1 studied using cysteine mutagenesis. *Biophysical Journal* 78:1852-1861.
- Minor DL, Lin YF, Mobley BC, Avelar A, Jan YN, Jan LY, Berger JM (2000). The polar T1 interface is linked to conformational changes that open the voltage-gated potassium channel. *Cell* 102:657-670.
- Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R. (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* 414(6859):37-42.
- Neher E, Sakmann B (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* 260:799-801.
- Numberger M, Draguhn A (1996). Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.
- Ottschytsch N, Raes AL, Timmermans JP, Snyders DJ (2005). Domain analysis of Kv6.3, an electrically silent channel. *Journal of Physiology* 568:737-747.
- Ottschytsch N, Raes A, Van Hoorick D, Snyders DJ (2002). Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel alpha-subunits identified in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99(12):7986-91.
- Patel AJ, Lazdunski M, Honore E (1997). Kv2.1/Kv9.3, an ATP-dependent delayed-rectifier K⁺ channel in pulmonary artery myocytes. *EMBO Journal* 16:6615-6625.

- Pioletti M, Findeisen F, Hura GL, Minor DL (2006). Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer. *Nature Structural & Molecular Biology* 13:987-995.
- Pongs O, Leicher T, Berger M, Roeper J, Bähring R, Wray D, Giese KP, Silva AJ, Storm JF (1999). Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel beta subunits. *Annals of the New York Academy of Sciences* 30; 868: 344-55.
- Post MA, Kirsch GE, Brown AM (1996). Kv2.1 and electrically silent Kv6.1 potassium channel subunits combine and express a novel current. *FEBS Letters* 399(1-2):177-82.
- Richardson FC, Kaczmarek LK (2000). Modification of delayed rectifier potassium currents by the Kv9.1 potassium channel subunit. *Hearing Research* 147:21-30.
- Robinson JM, Deutsch C (2005). Coupled tertiary folding and oligomerization of the T1 domain of Kv channels. *Neuron* 45:223-232.
- Roux B, MacKinnon R (1999). The cavity and pore helices in the KcsA K⁺ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* 285(5424):100-2.
- Rudy B (1988). Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 25:729-749.
- Ruppertsberg JP, Schroter KH, Sakmann B, Stocker M, Sewing S, Pongs O (1990). Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* 345(6275):535-7.
- Ruta V, Chen J, MacKinnon R (2005). Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K⁺ channel. *Cell* 123(3):463-75.

- Salinas M, de Weille J, Guillemare E, Lazdunski M, Hugnot JP (1997). Modes of regulation of shab K⁺ channel activity by the Kv8.1 subunit. *Journal of Biological Chemistry* 272(13):8774-80.
- Salinas M, Duprat F, Heurteaux C, Hugnot JP, Lazdunski M (1997). New modulatory alpha subunits for mammalian Shab K⁺ channels. *Journal of Biological Chemistry* 272(39):24371-9.
- Sano Y, Mochizuki S, Miyake A, Kitada C, Inamura K, Yokoi H, Nozawa K, Matsushime H, Furuichi K (2001). Molecular cloning and characterization of Kv6.3, a novel modulatory subunit for voltage-gated K⁺ channel Kv2.1. *FEBS Letters* 512(2002):230-234.
- Seoh SA, Sigg D, Papazian DM, Bezanilla F (1996). Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 16(6):1159-67.
- Sewing S, Roeper J, Pongs O (1996). Kv beta 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits. *Neuron* 16(2):455-63.
- Shen NV, Chen X, Boyer MM, Pfaffinger PJ (1993). Deletion analysis of K⁺ channel assembly. *Neuron* 11:67-76.
- Shibata R, Misonou H, Campomanes CR, Anderson AE, Schrader LA, Doliveira LC, Carroll KI, Sweatt JD, Rhodes KJ, Trimmer JS (2003). A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *Journal of Biological Chemistry* 278:36445-36454.
- Sigworth FJ (1993). Voltage gating of ion channels. *Quarterly Reviews of Biophysics* 27(1):1-40.

- Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML, Gagnon D, Rosales TO, Peiffer A, Anderson VE, Leppert M (1998). A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nature Genetics* 18:25-29.
- Spassova M, Lu Z (1998). Coupled ion movement underlies rectification in an inward-rectifier K⁺ channel. *Journal of General Physiology* 112(2):211-21.
- Strang C, Kunjilwar K, DeRubeis D, Peterson D, Pfaffinger PJ (2003). The role of Zn²⁺ in Shal voltage-gated potassium channel formation. *Journal of Biological Chemistry* 278:31361-31371.
- Terlau H, Stühmer W (1998). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Naturwissenschaften* 85:437-444.
- Tian C, Vanoye CG, Kang C, Welch RC, Kim HJ, George AL Jr, Sanders CR (2007). Preparation, Functional Characterization, and NMR Studies of Human KCNE1, a Voltage-Gated Potassium Channel Accessory Subunit Associated with Deafness and Long QT Syndrome. *Biochemistry* 46(41):11459-72.
- Tu L, Santarelli V, Sheng Z, Skach W, Pain D, Deutsch C (1996). Voltage-gated K⁺ channels contain multiple intersubunit association sites. *Journal of Biological Chemistry* 271:18904-18911.
- Vega-Saenz de Miera EC (2004). Modification of Kv2.1 K⁺ currents by the silent Kv10 subunits. *Brain Research, Molecular Brain Research* 123:91-103.
- Vennekamp J (2002). Synthese und elektrophysiologische Testung hochwirksamer Psoralenderivate als nicht-peptidische Blocker des lymphozytären Kaliumkanals Kv1.3. Dissertation Universität Kiel.

- Wang G, Covarrubias M (2006). Voltage-dependent gating rearrangements in the intracellular T1-T1 interface of a K⁺ channel. *Journal of General Physiology* 127:391-400.
- Wang G, Shahidullah M, Rocha CA, Strang C, Pfaffinger PJ, Covarrubias M (2005). Functionally active t1-t1 interfaces revealed by the accessibility of intracellular thiolate groups in kv4 channels. *Journal of General Physiology* 126:55-69.
- Wei A, Covarrubias M, Butler A, Baker K, Pak M, Salkoff L (1990). K⁺ current diversity is produced by an extended gene family conserved in *Drosophila* and mouse. *Science* 248(4955):599-603.
- Xu J, Yu W, Jan YN, Jan LY, Li M (1995). Assembly of voltage-gated potassium channels. Conserved hydrophilic motifs determine subfamily-specific interactions between the alpha-subunits. *Journal of Biological Chemistry* 270:24761-24768.
- Yellen G (1997). Single channel seeks permeant ion for brief but intimate relationship. *Journal of general Physiology* 110:83-85.
- Yellen G (1998). The moving parts of voltage-gated ion channels. *Quarterly Reviews of Biophysics* 3:239-295.
- Yellen G (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419(6902):35-42.
- Yellen G, Sodickson D, Chen TY, Jurman ME (1994). An engineered cysteine in the external mouth of a K⁺ channel allows inactivation to be modulated by metal binding *Biophysical Journal* 66(4):1068-75.

- Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW (1990). Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* 250(4980):568-71.
- Zheng J, Trudeau MC, Zagotta WN (2002). Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. *Neuron* 36:891-896.
- Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A, MacKinnon R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414(6859):23-4.
- Zhu X, Netzer R, Böhlke K, Liu Q, Pongs O (1999). Structural and functional characterization of Kv6.2, a new γ -subunit of voltage-gated potassium channel. *Receptors and channels* 6:337-350.
- Zünkler BJ, Kühne S, Ott T (1999). Kaliumkanäle und Kardiotoxizität von Arzneimitteln. *Bundesgesundheitsblatt* 42:631-638.

Abkürzungen

<i>hKv</i>	humaner spannungsabhängiger Kaliumkanal
<i>et al.</i>	<i>et alii:</i> und andere
IUPHAR	<i>International Union of Pharmacology</i>
H	Aminosäure Histidin
C	Aminosäure Cystein
G	Aminosäure Glycin
Y	Aminosäure Tyrosin
Na ⁺	Natriumion
K ⁺	Kaliumion
Ca ²⁺	Kalziumion
cm	Zentimeter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
°C	Grad Celsius
°K	Grad Kelvin
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
ca.	circa
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
min	Minute
s	Sekunde
ms	Millisekunde
µs	Mikrosekunde
µg	Mikrogramm
DNA	<i>deoxyribonucleic acid:</i> Desoxyribonukleinsäure

M	Mol
mol	molar
mM	millimolar
MΩ	Megaohm
V	Volt
mV	Millivolt
pF	Pikofarad
A	Ampere
nA	Nanoampere
mosmol	milliosmolar

Danksagung

Ich danke...

... Prof. Dr. T. Gudermann für die Möglichkeit in seinem Institut zu promovieren.

... Dr. Michael Mederos für die tagtägliche und manchmal auch nächtliche Betreuung nicht nur im Labor.

... meinen Mitdoktoranden Jens Emmel, Simone Meibers, Andreas Oldewurtel, Ursula Storch und Janine Wäring für geteiltes Leid ist halbes Leid.

... Kulturbeauftragte Eva Braun für Lösungen für viele Probleme.

... Hr. Schüler für die vielen technischen Hilfestellungen.

... meinen Eltern für all die Wegweiser und v.a. für ihre Geduld.

... den Eltern meiner Freundin Inga dafür, dass es meine Freundin Inga gibt.

