

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. Jürgen Daut

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

# **Charakterisierung von Modulationsmechanismen der Kv1-Ionenkanalfamilie: Lipidsensitivität, RNA Editierung und Inaktivierungspartikel**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)



dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Anne-Kathrin Streit

geboren am 17.11.1983 in Prüm

Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 20.04.2012 (Tag der Disputation).

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Niels Decher

Korreferent: Prof. Dr. Timothy Plant

# INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
1. Einleitung .....	5
1.1 Die physiologische Funktion der Kaliumkanäle.....	5
1.2 Die Gruppe der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle.....	5
1.2.1 Allgemeines Funktionsprinzip.....	5
1.2.2 Aufbau der Kv-Kanäle .....	6
1.2.3 Die Familie der Kv1-Kanäle.....	8
1.3 RNA Editierung .....	15
1.3.1 Basenmodifikation durch ADARs und CDARs.....	15
1.3.2 Die Familie der ADAR Enzyme .....	16
1.3.3 Neuronale Zielproteine der RNA Editierung durch ADAR Enzyme .....	17
1.3.4 RNA Editierung des humanen Kv1.1-Kanals .....	20
1.4 Zielsetzung.....	22
2. Materialien und Methoden .....	23
2.1 Molekularbiologie .....	23
2.1.1 Bakterienstämme .....	23
2.1.2 Antibiotika .....	23
2.1.3 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien mittels Hitzeschock .....	23
2.1.4 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien mittels Elektroporation.....	24
2.1.5 Kultivierung und Lagerung von Bakterien .....	24
2.1.6 Plasmidisolierung aus Bakterien im kleinen Maßstab - Minipräparation.....	24
2.1.7 Plasmidisolierung aus Bakterien im großen Maßstab - Midipräparation.....	25
2.1.8 Positionsgerichtete Mutagenese .....	25
2.1.9 Enzymatischer Verdau von DNA .....	25
2.1.10 Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	26
2.1.11 <i>In vitro</i> Transkription.....	26
2.1.12 Lithium-Chlorid-Präzipitation der cRNA .....	26
2.1.13 Agarose-Gelelektrophorese.....	27
2.1.14 Quantifizierung von RNA und DNA.....	27
2.1.15 Quantifizierung der RNA Editierung im entorhinalen Cortex .....	28
2.1.16 Sequenzierungen .....	28
2.1.17 Proteinextraktion aus <i>Xenopus</i> Oozyten.....	28
2.1.18 Auftrennung von Proteinen mittels SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	29

2.1.19	Proteindetektion mittels Western Blot.....	29
2.1.20	Quantifizierung der aufgetragenen Proteinmenge durch Analyse der Bandenintensitäten .....	30
2.1.21	Oberflächenexpressionsanalyse in <i>Xenopus</i> Oozyten.....	30
2.2	Zellkultur .....	32
2.2.1	Zelllinien.....	32
2.2.2	Kulturbedingungen .....	32
2.2.3	Passagieren der Zellen .....	32
2.2.4	Aussäen von Zellen.....	33
2.2.5	Transfektion .....	33
2.2.6	Verwendete Plasmide .....	34
2.3	Elektrophysiologie .....	35
2.3.1	Zusammensetzung der Lösungen .....	35
2.3.2	cRNA-Injektion in <i>Xenopus Laevis</i> Oozyten .....	36
2.3.3	Messungen in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) .....	36
2.3.4	Einzelkanalmessungen in der On-cell Konfiguration.....	37
2.3.5	Ganzellstrommessungen in der Whole-cell Konfiguration.....	37
2.3.6	Statistische und weitere mathematische Auswertungen .....	38
2.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	38
3.	Ergebnisse .....	39
3.1	Untersuchungen zur veränderten Pharmakologie editierter Kv1.1-Kanäle.....	39
3.1.1	Auswirkung der I400V Editierung auf die Stromreduktion durch endogene Fettsäuren.....	39
3.1.2	Aufklärung des Blockmechanismus der HUFAs .....	40
3.2	Untersuchungen zur pathophysiologischen Relevanz der Kv1.1 Editierung .....	48
3.2.1	Die vermehrte Kv1.1-Editierung im entorhinalen Cortex epileptischer Ratten bewirkt eine verminderte 4-AP Sensitivität heteromerer Kv1-Kanäle .....	49
3.2.2	Untersuchung der Spannungsabhängigkeit und Kinetik des 4-AP Blocks.....	50
3.3	Untersuchungen zur veränderten Stromgröße editierter Kv1.1-Kanäle.....	51
3.3.1	Validierung des Stromgrößeneffektes in einer humanen Zelllinie .....	52
3.3.2	Vergleich der Spannungsabhängigkeit von Kv1.1- und I400V-Kanälen .....	53
3.3.3	Untersuchung der Einzelkanaleigenschaften von Kv1.1- und I400V-Kanälen..	54
3.3.4	Untersuchung der Oberflächenexpression von Kv1.1- und I400V-Kanälen .....	56
3.4	Konformation und Regulation des Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikels .....	61
3.4.1	Identifizierung der für die Inaktivierung essentiellen Aminosäuren.....	61
3.4.2	Phosphoinositide regulieren die Kv $\beta$ 1.3-abhängige Inaktivierung.....	62

3.4.3	Der R5C-Austausch führt eine Oxidationssensitivität der Inaktivierung ein.....	63
3.4.4	Die Oxidationssensitivität von Kv $\beta$ 1.3-R5C beruht auf der Konformation des Inaktivierungspartikels.....	65
3.4.5	Strukturmodell des Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikels in der Pore des Kv1.5-Kanals.....	66
4.	Diskussion.....	68
4.1	Lipide blockieren die innere Kanalpore von Kv-Kanälen.....	68
4.2	Folgen der veränderten Pharmakologie editierter Kv1.1-Kanäle.....	69
4.3	Grundlage der verminderten Stromamplitude editierter Kv1.1-Kanäle.....	71
4.4	Funktionsgewinn oder Funktionsverlust durch die I400V Editierung?.....	74
4.5	Pathologische Relevanz des Kv1.1-Kanals und dessen RNA Editierung.....	74
4.5.1	Veränderte RNA Editierungslevel in epileptogenem Gewebe.....	74
4.5.2	Funktionsverlust des Kv1.1-Kanals löst Episodische Ataxie aus.....	75
4.5.3	Problematiken bei der Untersuchung von RNA Editierung.....	76
4.6	Evolutionäre Konservierung der Kv1.1 Editierungsstelle.....	76
4.7	Konformation und Regulation des Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikels.....	77
4.7.1	Konformation des Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikels.....	77
4.7.2	Regulation des Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikels.....	77
4.7.3	Regulation der membranären PIP-Level.....	78
4.7.4	Physiologische Relevanz der Regulation der A-Typ Inaktivierung.....	79
4.8	Ausblick.....	80
5.	Literaturverzeichnis.....	81
6.	Anhänge.....	91
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	91
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	94
6.3	Eigene Publikationen.....	96
6.4	Liste der akademischen Lehrer.....	97
6.5	Danksagung.....	98

## ZUSAMMENFASSUNG

Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Kv-Kanäle) sind an der Regulation neuronaler und kardialer Aktivität beteiligt. Sie öffnen bei Depolarisation der Zelle und leiten unter physiologischen Bedingungen Kaliumauswärtsströme, wodurch sie zur Repolarisation beitragen. Kv-Kanäle modulieren die Dauer von Aktionspotentialen und die Erregbarkeit der Zellen. Die funktionellen Kanäle setzen sich aus vier  $\alpha$ -Untereinheiten zusammen, die gemeinsam eine zentrale Kanalpore bilden. Verschiedene Regulationsmechanismen können die Kanalfunktion beeinflussen. Zu den physiologischen Regulationsmechanismen gehören unter anderem die durch endogene mehrfach ungesättigte Lipide induzierte Inaktivierung von Kv-Kanälen, die RNA Editierung des Kv1.1-Kanals, welche zu einem Austausch von Isoleucin gegen Valin innerhalb der zentralen Pore führt sowie die Inaktivierung durch akzessorische Untereinheiten. Sowohl der zugrunde liegende Mechanismus der durch Lipide induzierten Inaktivierung als auch die Folgen der Kv1.1 RNA Editierung sind bisher nur ansatzweise bekannt und wurden in der hier vorliegenden Arbeit genauer untersucht. Zudem wurde die Konformation des Inaktivierungspartikels der akzessorischen Kv $\beta$ 1.3-Untereinheit und die Regulation der durch sie eingeführten A-Typ Inaktivierung analysiert.

Zunächst wurde der Mechanismus der Inaktivierung durch endogene Lipide wie Arachidonsäure, Docosahexaensäure und Anandamid anhand verschiedener Methoden untersucht. Die Charakteristika der Inaktivierung wie Kinetik, Konkurrenz mit dem Porenblocker TEA und Beeinflussung durch Mutationen in der zentralen Pore sowie die *in silico* Modelle zeigen, dass eine physikalische Blockade der offenen Kanalpore den wahrscheinlichsten Mechanismus der Inhibition durch Lipide darstellt.

Untersuchungen der funktionellen Folgen der Kv1.1 RNA Editierung ergaben, dass editierte Kanäle eine verminderte Sensitivität gegenüber Porenblockern aufweisen. Dazu zählen sowohl die Substanzen 4-Aminopyridin (4-AP) und Psoralen-4, welche experimentell und klinisch genutzt werden, als auch die in dieser Studie neu als Porenblocker identifizierten Lipide und deren verwandte Substanzen. Zudem konnte gezeigt werden, dass editierte Kv1.1-Untereinheiten durch Heteromerisierung die Pharmakologie und Lipidsensitivität aller Kv1-Kanäle modulieren können.

Im Rahmen der funktionellen Charakterisierung von editierten Kv1.1-Kanälen wurde in verschiedenen Expressionssystemen eine Verringerung der Stromgröße als Folge der Editierung beobachtet. Daraufhin wurde die molekulare Grundlage dieser Stromverringering untersucht. Messungen auf Einzelkanal- und Ganzzelebene sowie Quantifizierung der

Proteinmenge ergaben, dass die Editierung weder Veränderungen im Öffnungs- und Schließverhalten noch in der Gesamtmenge der Kanalproteine zur Folge hat. Es konnte jedoch eine signifikant verminderte Oberflächenexpression der editierten Kv1.1-Kanaluntereinheiten nachgewiesen werden, die wahrscheinlich für den geringeren Gesamtstrom verantwortlich ist. Diese Ergebnisse beschreiben erstmals eine Modulation des intrazellulären Transportes der Kv1.1-Kanaluntereinheiten durch RNA Editierung.

Eine pathophysiologische Relevanz der RNA Editierung des Kv1.1-Kanals wird in Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der Epilepsie vermutet. Eine Quantifizierung der Kv1.1 Editierungsrate im entorhinalen Cortex chronisch epileptischer Ratten des Kainat-induzierten Tiermodells zeigte eine erhöhte Editierungsrate im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Die epileptischen Tiere zeichnen sich durch eine Resistenz gegenüber 100  $\mu\text{M}$  des iktogenen Kv-Kanalblockers 4-AP aus, einer Konzentration, die in gesunden Kontrolltieren epileptiforme Potentiale auslöst. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der erhöhten Editierungsrate auf diese Konzentration an 4-AP anhand elektrophysiologischer Versuche im Expressionssystem untersucht. Während eine Beeinflussung des Zeitverlaufes oder der Spannungsabhängigkeit des 4-AP Blocks durch die beobachtete Erhöhung der Editierungsrate ausgeschlossen werden konnte, wurde eine signifikante Verminderung der 4-AP Sensitivität festgestellt. Diese, auf der erhöhten Editierungsrate beruhende, verminderte 4-AP Sensitivität von Kv1-Kanälen liegt vermutlich der veränderten 4-AP Sensitivität der epileptischen Tiere zugrunde.

Neben der RNA Editierung wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit Aspekte der Inaktivierung von Kv1-Kanälen untersucht. Kv $\beta$ 1-Untereinheiten können nach Assoziation mit Kv1-Kanälen eine schnelle A-Typ Inaktivierung hervorrufen. Anhand elektrophysiologischer Versuche und Molecular Modelling wurde die Konformation bzw. der Bindungsmodus des Inaktivierungspartikels der Kv $\beta$ 1.3-Untereinheit analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass der Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikel während der Bindung innerhalb der zentralen Pore des Kv1.5-Kanals am wahrscheinlichsten in einer Haarnadelkonformation vorliegt. Zudem konnte ich zeigen, dass die Kv $\beta$ 1.3-induzierte Inaktivierung durch Phosphoinositide reguliert werden kann.

## SUMMARY

Voltage-gated potassium channels (Kv-channels) participate in the regulation of neuronal and cardiac activity. They open upon depolarization of the cell and conduct potassium outward currents under physiological conditions, thus contributing to repolarization. Kv-channels modulate action potential duration and cell excitability. Functional channels are composed of four  $\alpha$ -subunits that jointly form a central channel pore. Different regulatory mechanisms can influence channel function. Amongst others, the physiological regulatory mechanisms include inactivation of Kv-channels induced by endogenous lipids, the RNA editing of the Kv1.1-channel, which leads to an exchange of isoleucine for valine within the central pore, as well as inactivation induced by accessory subunits. The underlying mechanism for lipid-induced inactivation and the consequences of Kv1.1 RNA editing are only partly understood and were examined in more detail in the present study. Furthermore, the structure of the inactivation particle of the accessory Kv $\beta$ 1.3-subunit and the regulation of inactivation by this subunit were analyzed.

First, the mechanism of channel inhibition by endogenous lipids like arachidonic acid, docosahexaenoic acid and anandamide was analyzed with the help of different methods. The characteristics of the inactivation such as kinetics, competition with the pore blocker TEA and influence by mutations in the central pore as well as the *in silico* models suggest that a physical occlusion of the open channel pore is the most likely mechanism for channel inhibition by lipids.

Examination of the functional consequences of Kv1.1 RNA editing showed that edited channels exhibit a reduced sensitivity to pore blockers. This applies to the substances 4-Aminopyridine (4-AP) and Psoralen-4, which are used for experimental and clinical purposes, as well as to the lipids and related substances that have been newly identified as pore blockers in this study. Furthermore, it could be demonstrated that edited Kv1.1 subunits can modulate the pharmacology and lipid sensitivity of all Kv1-channels through heteromerization with other Kv1 channel subunits.

In the course of the functional characterization of edited Kv1.1-channels a reduced current amplitude due to the editing was observed in different expression systems. Thereupon, the molecular correlates of this current reduction were investigated. Recordings on single-channel and whole-cell level and quantification of protein amount revealed that the editing does not cause changes neither in gating nor in the total amount of channel protein. However, a significantly diminished surface expression of edited Kv1.1-channel subunits

could be detected, which is likely to be responsible for the reduced total current. These results describe for the first time a modulation of intracellular transport of Kv1.1-channel subunits by RNA editing.

A pathophysiological relevance of Kv1.1 RNA editing is assumed in the context of epilepsy. A quantification of the extent of Kv1.1 editing in the entorhinal cortex of chronic epileptic rats from the kainic acid induced animal model showed an increased editing ratio in comparison to healthy control animals. Characteristic of epileptic animals is a resistance to 100  $\mu$ M of the ictogenic Kv-channel blocker 4-AP, a concentration that induces epileptiform potentials in healthy control animals. In the present work, the effects of the increased editing ratio on this 4-AP concentration were examined in electrophysiological experiments in an expression system. While any influence of the observed increase in editing ratio on the time course or voltage-dependence of 4-AP block could be ruled out, a significant reduction of 4-AP sensitivity was detected. This reduced 4-AP sensitivity of Kv1-channels which is caused by the elevated editing ratio is presumably the basis of the altered 4-AP sensitivity of epileptic animals.

Furthermore, aspects of the inactivation of Kv1-channels were examined in the course of this study. Kv $\beta$ 1-subunits can induce fast A-type inactivation when attached to Kv1-channels. The conformation (or rather the binding mode) of the inactivation particle of the Kv $\beta$ 1.3-subunit was analyzed by means of electrophysiological experiments and molecular modelling. The results suggest that the Kv $\beta$ 1.3 inactivation particle most probably adopts a hairpin conformation when bound within the central pore of the Kv1.5-channel. Moreover, I could show that the Kv $\beta$ 1.3-induced inactivation can be regulated by phosphoinositides.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Die physiologische Funktion der Kaliumkanäle

Ionenkanäle sind transmembranäre Proteine, die sich durch ihre Selektivität für bestimmte Ionen und eine steuerbare Änderung der Leitfähigkeit für diese Ionen auszeichnen. Ionenkanäle modulieren somit die Aktivität erregbarer Zellen. Die Gruppe der Kaliumkanäle spielt eine wichtige Rolle bei der Repolarisation, der Hyperpolarisation und der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials der Zelle. Ihr Öffnen bewirkt unter physiologischen Bedingungen einen Ausstrom von  $K^+$ -Ionen aus der Zelle, was eine Verschiebung des Membranpotentials in Richtung des Kaliumgleichgewichtspotentials bewirkt. Das Kaliumgleichgewichtspotential hängt von dem Verhältnis der intra- und extrazellulären Kaliumkonzentrationen ab und beträgt in Neuronen ca. -70 mV und in Skelett- und Herzmuskeln ca. -90 mV (Schmidt & Thews, 2007). Da das Ruhemembranpotential der meisten Körperzellen hauptsächlich durch Kaliumleitfähigkeiten bestimmt wird, ist es nahe dem Kaliumgleichgewichtspotential angesiedelt. Innerhalb der großen Gruppe der Kaliumkanäle gibt es verschiedene Kanalfamilien mit unterschiedlichen Topologien und Funktionen.

## 1.2 Die Gruppe der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle

### 1.2.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Allen spannungsgesteuerten Kaliumkanälen (Kv-Kanälen) ist gemeinsam, dass sie bei Depolarisation der Membran über ein bestimmtes Schwellenpotential hinaus öffnen (Aktivierung). Bei Repolarisation der Membran schließen sie (Deaktivierung) und einige Mitglieder der Kv-Kanalgruppe zeigen zusätzlich eine Inaktivierung bei anhaltender Depolarisation. Die Kinetik der Aktivierung, Inaktivierung und Deaktivierung hängt stark von der Kanalzusammensetzung ab.

## 1.2.2 Aufbau der Kv-Kanäle

### 1.2.2.1 Aufbau der $\alpha$ -Untereinheiten

Ein funktioneller Kanal besteht aus vier Kv  $\alpha$ -Untereinheiten. Die  $\alpha$ -Untereinheiten der Kv-Kanäle können in 12 Kv-Kanalfamilien (Kv1-Kv12) eingeteilt werden (Gutman *et al*, 2005). Alle Kv-Kanäle haben eine sehr ähnliche Topologie: Eine  $\alpha$ -Untereinheit weist sechs Transmembrandomänen (S1-S6) und einen intrazellulären N- und C-Terminus auf. Die vierte Transmembrandomäne (S4) besitzt mehrere positiv geladene Aminosäurereste in Form von basischen Argininen (R) und Lysin (K) (Abb. 1.1 A) und kann Änderungen in der

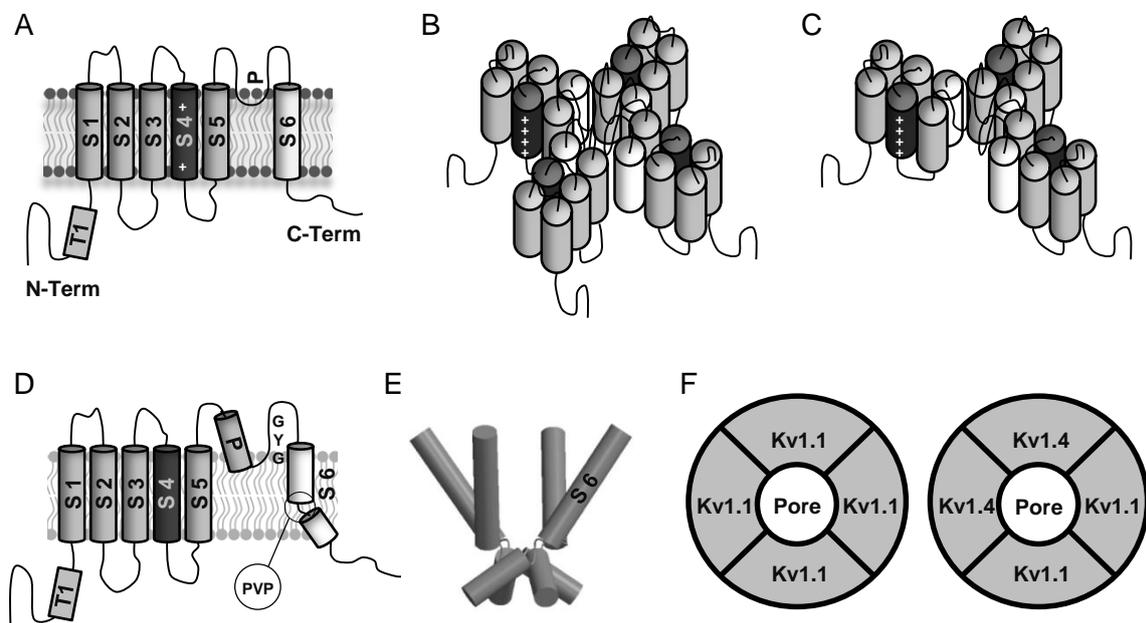


Abb. 1.1: **Struktur und Funktion von Kv-Kanälen.** **A)** Die  $\alpha$ -Untereinheiten von Kv-Kanälen besitzen sechs Transmembrandomänen (S1-S6) und eine Porenschleife (P), welche an der Bildung der oberen Porenregion und des Selektivitätsfilters beteiligt ist. Die T1-Domäne dient der Interaktion zwischen den  $\alpha$ -Untereinheiten im Kanaltetramer und der Anlagerung von akzessorischen  $\beta$ -Untereinheiten. Das S4-Segment besitzt positiv geladene Aminosäurereste und dient als Spannungssensor. **B)** Ein funktioneller Kv-Kanal besteht aus vier  $\alpha$ -Untereinheiten. Die S5- und S6-Segmente (weiß) sowie die Porenschleifen bilden die zentrale Pore. Die S4-Segmente (schwarz) dienen als Spannungssensoren. **C)** Zur Veranschaulichung sind nur drei Untereinheiten gezeigt, man blickt in die zentrale Pore des Kanals (modifiziert nach Nerbonne, 2000). **D)** Innerhalb der Porenschleife zwischen dem S5- und S6-Segment der  $\alpha$ -Untereinheiten von Kv-Kanälen befindet sich die Porenhelix (P). Auf diese folgt der Selektivitätsfilter, welcher durch die Aminosäureabfolge Glycin-Tyrosin-Glycin (GYG) gebildet wird. Die  $\alpha$ -Helix des S6-Segmentes wird durch das Motiv Prolin-Valin-Prolin (PVP) unterbrochen. Diese Unterbrechung fungiert womöglich als molekulares „Gelenk“. **E)** Ein schematisches Modell der vier S6-Segmente im tetrameren Kanal; die Biegung der S6-Segmente im Bereich des PVP-Motives stellt eine Engstelle im unteren Bereich des Kanals dar (modifiziert nach Sansom *et al*, 2002). **F)** Funktionelle Kanaltetramere können entweder als Homomere vorliegen, die nur einen Subtyp an  $\alpha$ -Untereinheiten beinhalten (links), oder als Heteromere, welche  $\alpha$ -Untereinheiten verschiedener Subtypen einer Kanalfamilie aufweisen (rechts).

transmembranären Spannung in Konformationsänderungen des Kanals umsetzen. Somit dient sie als Spannungssensor der Kv-Kanäle (Bezanilla, 2000). Die Assemblierung der  $\alpha$ -Untereinheiten zu funktionellen Kanaltetrameren wird durch eine N-terminale Tetramerisierungsdomäne (T1) vermittelt (Yi *et al*, 2001).

#### 1.2.1.2 Struktur und Funktion im Bereich der inneren Kanalpore

Die S6-Segmente bilden die Seitenwände der zentralen Pore (Abb. 1.1 B und C). Der Selektivitätsfilter, welcher die hohe Selektivität für  $K^+$ -Ionen vermittelt, befindet sich im aufsteigenden Teil der Porenschleife zwischen dem S5- und S6-Segment und besteht aus der Aminosäureabfolge Threonin-Valin-Glycin-Tyrosin-Glycin (TVGYG). Diese Aminosäureabfolge wird als Konsensus-Sequenz der Kaliumkanäle bezeichnet (Abb. 1.1 D), da sie in (fast) allen Kaliumkanälen konserviert ist (Doyle, 1998). Der Selektivitätsfilter (GYG) stellt den engsten Teil der Pore dar und bildet mit den Sauerstoffatomen der Carbonylgruppen vier Bindungsstellen für  $K^+$ -Ionen. Die Carbonyl-Sauerstoffatome der vier Untereinheiten eines Kanals ersetzen die Sauerstoffatome der Hydrathülle, die das  $K^+$ -Ion in Lösung umgibt, sodass das  $K^+$ -Ion den Selektivitätsfilter ohne Hydrathülle passiert (Zhou *et al*, 2001a).

Eine weitere Engstelle in der Pore des Kanals befindet sich in der Nähe der intrazellulären Öffnung und wird durch das ebenfalls stark konservierte Prolin-Valin-Prolin (PVP)-Motiv gebildet. Die Aminosäure Prolin unterbricht helikale Strukturen und führt somit „Knicke“ ein (von Heijne, 1991). Durch das PVP-Motiv im S6-Segment wird die  $\alpha$ -Helix des Transmembransegmentes auf einem kurzen Abschnitt unterbrochen, wodurch eine Art bewegliches „Gelenk“ entsteht, welches dynamische Konformationsänderungen des Kanals ermöglicht (Abb. 1.1 D). Es wird vermutet, dass in diesem Bereich zumindest zeitweise eine Engstelle im Kanal entstehen kann und das PVP-Motiv somit am Öffnungs- und Schließverhalten der Kv-Kanäle beteiligt ist (Abb. 1.1 E) (Sansom *et al*, 2002).

#### 1.2.1.2 Homomere und heteromere Kv-Kanäle

Wie bereits erwähnt sind funktionelle Kv-Kanäle Tetramere (Abb. 1.1 B). Ein Kanaltetramer kann als Homomer aus vier identischen  $\alpha$ -Untereinheiten vorliegen (z.B. vier Kv1.1-Untereinheiten) oder als Heteromer, welches verschiedene Untereinheiten einer Kanalfamilie beinhaltet (z.B. Kv1.1- und Kv1.4-Untereinheiten) (Abb. 1.1 F). Die Heteromerbildung

beschränkt sich jedoch auf die  $\alpha$ -Untereinheiten innerhalb einer Kv-Kanalfamilie, sodass Kv1-Untereinheiten nicht mit solchen aus den anderen Familien (Kv2-Kv12) heteromerisieren (Li *et al*, 1992; Shen & Pfaffinger, 1995).

### 1.2.3 Die Familie der Kv1-Kanäle

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Kv1-Kanalfamilie. Diese umfasst acht Mitglieder (Kv1.1-Kv1.8), die unterschiedliche Expressionsmuster im Organismus zeigen. In humanen Neuronen und Gliazellen sind hauptsächlich die Untereinheiten Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 und Kv1.4 zu finden, welche dort auch Heteromere bilden können (Song, 2002; Coleman *et al*, 1999). Auch andere Organe zeigen charakteristische Expressionsprofile der Kv1-Untereinheiten: Im Herzen sind vorwiegend Kv1.5- (Snyders *et al*, 1993), in der Niere Kv1.2- und Kv1.3- (Wang, 2004) und in Lymphozyten ebenfalls Kv1.3-Untereinheiten exprimiert (Beeton & Chandy, 2005).

#### 1.2.3.1 Öffnungs- und Schließverhalten der Kv1-Kanäle

Die Kv1-Kanäle sind homolog zum *Shaker*-Kanal der *Drosophila*, welcher als erster Kv-Kanal 1987 kloniert wurde (Kamb *et al*, 1987). Der *Shaker*-Kanal besitzt einen N-terminalen Inaktivierungspartikel, der von der zytoplasmatischen Seite in die offene Pore des Kanals eindringt und diese blockiert. Dies führt zu einer schnellen Inaktivierung des Kanals im einstelligen bis zweistelligen Millisekunden-Bereich und reduziert so den Stromfluss. Diese Art der Inaktivierung wird A-Typ oder, aufgrund der Lage des Inaktivierungspartikels, auch N-Typ Inaktivierung genannt. Von den Mitgliedern der Kv1-Kanalfamilie weist nur der Kv1.4-Kanal eine solche N-terminale Inaktivierungsdomäne auf und unterliegt somit einer A-Typ Inaktivierung.

Eine weitere Inaktivierungskomponente bei Kv-Kanälen ist die sogenannte C-Typ Inaktivierung. Diese bleibt auch bei N-terminal trunkierten Kanälen bestehen. Die Bezeichnung C-Typ Inaktivierung geht darauf zurück, dass man zunächst einen zweiten Inaktivierungspartikel im C-Terminus des Kanals vermutete. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass dies nicht zutrifft und stattdessen die Inaktivierung auf einer Konformationsänderung des Kanals im oberen S6-Segment und der Porenschleife, also im Bereich der extrazellulären Porenöffnung, beruht (Molina *et al*, 1997; Hoshi *et al*, 1991). Wahrscheinlich ist daran ein partieller Porenkollaps im Bereich des Selektivitätsfilters

beteiligt (Kurata & Fedida, 2006). Die C-Typ Inaktivierung ist in der Regel wesentlich langsamer als die A-Typ Inaktivierung, wobei die Zeitkonstanten beider Inaktivierungsformen zum einen von der Kanalzusammensetzung, aber auch von der membranären und intrazellulären Umgebung abhängig sind. Kanäle, welche nur eine langsame C-Typ Inaktivierung aufweisen, werden als verzögerte Gleichrichter (engl.: „delayed rectifier“) bezeichnet. Bei Repolarisation der Zelle werden die Kanäle wieder geschlossen. Dieser Vorgang wird Deaktivierung genannt und ist mechanistisch gesehen das Gegenstück zur Aktivierung, da sie durch die Rückbewegung des Spannungssensors aufgrund der Repolarisation ausgelöst wird.

### 1.2.3.2 Akzessorische Kv $\beta$ -Untereinheiten modulieren Kinetik, Transport und Spannungsabhängigkeit von Kv1-Kanälen

Die A-Typ Inaktivierung wird durch Inaktivierungspartikel vermittelt. Im Falle des *Shaker*- und des Kv1.4-Kanals sind diese Inaktivierungspartikel im N-Terminus der Kanal- $\alpha$ -Untereinheiten lokalisiert (Abb. 1.2 A). Neben den kanalbildenden  $\alpha$ -Untereinheiten besitzen funktionelle Kv-Kanäle meist akzessorische Proteine, die an das Kanaltetramer aus  $\alpha$ -Untereinheiten binden und dessen Funktion und/oder intrazellulären Transport modulieren. Die wichtigsten akzessorischen Proteine von Kv1-Kanälen sind Kv $\beta$ 1- und Kv $\beta$ 2-

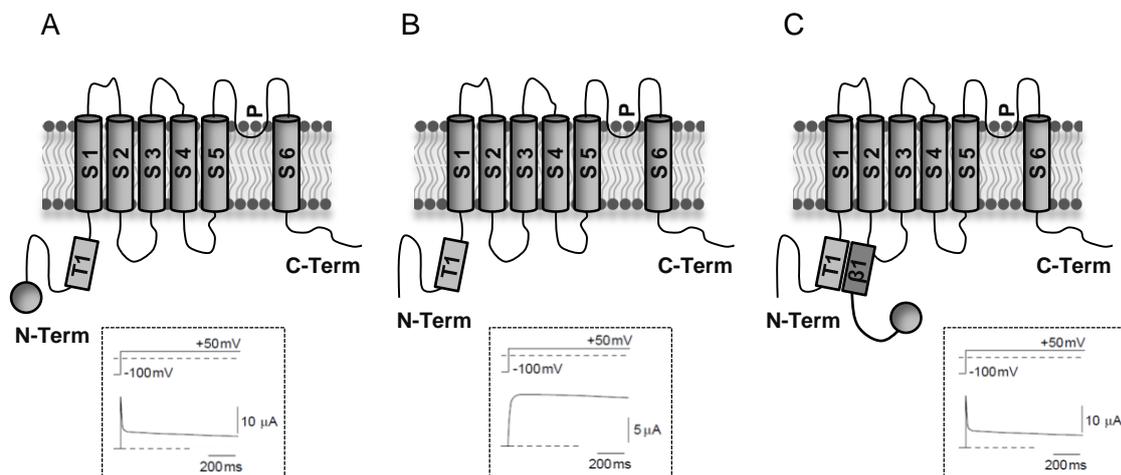


Abb. 1.2: **Strukturelle Grundlagen der A-Typ Inaktivierung.** **A)** Der N-terminale Inaktivierungspartikel induziert eine schnelle A-Typ Inaktivierung der funktionellen Kanäle (siehe Beispielstrom, unten). **B)**  $\alpha$ -Untereinheiten, die keinen Inaktivierungspartikel besitzen, weisen nur eine langsame C-Typ Inaktivierung auf (siehe Beispielstrom, unten). **C)** Akzessorische  $\beta$ -Untereinheiten, welche einen Inaktivierungspartikel aufweisen, führen nach Anlagerung im Bereich der T1-Domäne ebenfalls eine schnelle A-Typ Inaktivierung bei den betroffenen Kanälen ein (siehe Beispielstrom, unten). Abbildungen in den Boxen wurden modifiziert nach Robertson, 1997.

Untereinheiten. Diese binden an die T1-Domäne im N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheiten. Die N-terminale T1-Domäne der Kanäle dient somit neben der Tetramerisierung auch der Anlagerung von akzessorischen Kv $\beta$ -Untereinheiten (Sewing *et al*, 1996). Kristallstrukturen des Kv1.2-Kanals der Ratte haben gezeigt, dass pro Kanal- $\alpha$ -Untereinheit eine  $\beta$ -Untereinheit im Kanalkomplex vorhanden ist (1:1 Stöchiometrie) (Long *et al*, 2005).

Es gibt drei Kv $\beta$ 1-Untereinheiten (Kv $\beta$ 1.1-Kv $\beta$ 1.3), die auf alternatives Spleißen des selben Gens zurückzuführen sind (England *et al*, 1995) und alle einen N-terminalen Inaktivierungspartikel besitzen. Der C-Terminus dient der Bindung an die T1-Domäne der  $\alpha$ -Untereinheiten und ist konserviert (Abb. 1.2 C) (Leicher *et al*, 1998). Den  $\alpha$ -Untereinheiten der verzögerten Gleichrichter-Kanäle der humanen Kv1-Kanalfamilie (alle Kv1-Kanäle mit Ausnahme des Kv1.4) fehlt ein N-terminaler Inaktivierungspartikel, sie weisen daher keine schnelle Inaktivierung auf (Abb. 1.2 B). Durch Anlagerung der akzessorischen Kv $\beta$ 1-Untereinheiten entsteht ein Kanalkomplex, welcher aufgrund der Inaktivierungspartikel der Kv $\beta$ 1-Untereinheiten eine A-Typ Inaktivierung aufweist (Abb. 1.2 C). Kv $\beta$ 2-Untereinheiten besitzen keinen Inaktivierungspartikel und fügen folglich keine A-Typ Inaktivierung ein. Sowohl Kv $\beta$ 1- als auch Kv $\beta$ 2-Untereinheiten haben Effekte auf den ER-Export und somit die Oberflächenexpression von Kv1-Kanälen (Campomanes *et al*, 2002), zudem können sie die Aktivierungsschwelle der Kanäle zu negativeren Potentialen verschieben (Heinemann *et al*, 1996; Peters *et al*, 2009).

	1	5	10
hKv $\beta$ 1.3	M	L A A R T	G A A G S
hKv $\beta$ 1.2	M	H L Y K P A C A D I	
hKv $\beta$ 1.1	M	Q V S I A C T E H N	

Abb. 1.3: **N-terminale Aminosäuresequenzen der drei Spleißvarianten von Kv $\beta$ 1.** Die für die A-Typ Inaktivierung verantwortlichen N-Termini von Kv $\beta$ 1.1, Kv $\beta$ 1.2 und Kv $\beta$ 1.3 besitzen aufgrund des Spleißens verschiedene Aminosäuresequenzen.

Es gibt drei alternative „erste Exone“ des Kv $\beta$ 1-Gens, sodass sich die drei Spleißvarianten der Kv $\beta$ 1-Untereinheit (Kv $\beta$ 1.1-Kv $\beta$ 1.3) in ihrer N-terminalen Struktur unterscheiden (Abb. 1.3). In diesem Bereich befindet sich auch der Inaktivierungspartikel. Der C-Terminus, der für die Interaktion mit den Kanal- $\alpha$ -Untereinheiten von Bedeutung ist, ist hingegen konserviert. Alle Kv $\beta$ 1-

Spleißvarianten können eine A-Typ Inaktivierung induzieren, die verschiedenen Sequenzen ihrer Inaktivierungspartikel führen jedoch zu Unterschieden in den Parametern der Inaktivierung. So wurde beispielsweise beschrieben, dass Kv $\beta$ 1.2 eine potentere Inaktivierung verschiedener Kv1-Kanäle hervorruft als Kv $\beta$ 1.3 (Wang *et al*, 1996).

### 1.2.3.3 Regulation der Kv $\beta$ 1-induzierten A-Typ Inaktivierung

Der Prozess der A-Typ Inaktivierung wird einerseits von der Zusammensetzung der Kanalkomplexe aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten bestimmt. Andererseits gibt es verschiedene intrazelluläre Einflüsse, welche die A-Typ Inaktivierung modulieren können.

Eine wichtige Rolle spielen die intrazelluläre Calcium-Konzentration [ $\text{Ca}^{2+}$ ] sowie das oxidative Potential (Jow *et al*, 2004; Wang *et al*, 1996). Die Inaktivierung durch Kv $\beta$ 1.1 und Kv $\beta$ 1.2 ist sensitiv gegenüber Oxidation. Durch Applikation oxidierender Substanzen kann die A-Typ Inaktivierung aufgehoben werden. Dies ist auf Cysteinreste innerhalb der N-Termini zurückzuführen (C7 bei Kv $\beta$ 1.1 bzw. C8 bei Kv $\beta$ 1.2) (Wang *et al*, 1996). Kv $\beta$ 1.3 weist in diesem Bereich keine Cysteinreste auf (siehe Abb 1.3) und spricht nicht auf Änderungen des oxidativen Potentials der Umgebung an (Wang *et al*, 1996).

Die Kv $\beta$ 1.1 vermittelte Inaktivierung von Kv1.1-Kanälen wird zudem durch Erhöhung von [ $\text{Ca}^{2+}$ ] antagonisiert. Diese Regulation durch Calcium wird durch den N-Terminus von Kv $\beta$ 1.1 vermittelt. Der molekulare Mechanismus dieser Regulation ist noch unbekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass der Calcium-Effekt unabhängig von oxidativen Einflüssen ist (Jow *et al*, 2004).

### 1.2.3.4 Blockade der inneren Kanalpore durch TEA und 4-AP

Die innere Pore der Kv1-Kanäle ist hochkonserviert. Das heißt alle Kv1-Subtypen besitzen nahezu identische Aminosäuresequenzen in ihren S5- und S6-Segmenten sowie in der dazwischenliegenden Porenschleife. Substanzen, die durch Bindung in der inneren Kanalpore Kv-Kanäle blockieren, sind daher bezüglich der verschiedenen Kv1-Subtypen relativ unselektiv (Nguyen *et al*, 1994). Klassische Blocker der offenen Kanalpore dringen von der zytosolischen Seite in diese ein und machen sie undurchlässig für Kaliumionen. Zu den klassischen Blockern der offenen Pore von Kv1-Kanälen zählen 4-Aminopyridin (4-AP) und Tetraethylammonium (TEA). Beide Substanzen weisen jedoch noch weitere Blockmechanismen auf, die im Folgenden erläutert werden.

Wie zu erwarten ist, können 4-AP und TEA nur dann die innere Pore blockieren, wenn die Kanäle zuvor durch Depolarisation geöffnet wurden (Bouchard *et al*, 1995; Choi *et al*, 1993). Umgekehrt kann eine Blockade durch 4-AP mittels Auswaschen des Blockers auch nur dann aufgehoben werden, wenn die Kanäle geöffnet sind, da 4-AP ansonsten in der Pore

eingeschlossen ist (Choi *et al*, 1993). Die Anwesenheit von TEA in der zentralen Pore verhindert hingegen das vollständige Schließen des Kanals, was zu einer verlangsamten Deaktivierung führt, da TEA die Pore zuerst verlassen muss, bevor der Kanal schließt. Experimentell spiegelt sich dies in einer Überkreuzung der Deaktivierungsströme (transienter Strom während des Schließens) vor und nach TEA-Applikation wider (Choi *et al*, 1993). Dieses Verhalten ist bei 4-AP nicht zu beobachten, 4-AP scheint vielmehr während der Deaktivierung in der Pore zu verbleiben (Rasmusson *et al*, 1995). Eine Verlangsamung der Deaktivierung kann somit als Indiz für eine Blockade innerhalb der zentralen Poren angesehen werden, ist aber kein zwingendes Charakteristikum. Während 4-AP bei extrazellulärer Applikation durch die Membran diffundieren kann, ist TEA nicht membrangängig und muss folglich intrazellulär appliziert werden, um die innere Pore blockieren zu können (MacKinnon & Yellen, 1990; Choi *et al*, 1993). TEA besitzt zusätzlich eine Bindungsstelle im extrazellulären Porenbereich von Kv-Kanälen, sodass auch eine Blockade des Kanals von außen möglich ist (MacKinnon & Yellen, 1990). 4-AP scheint neben der Blockade der offenen Kanalpore ebenfalls weitere Blockmechanismen aufzuweisen, eine zusätzliche Blockade des geschlossenen Kanalzustandes durch 4-AP wird diskutiert (Yao & Tseng, 1994, Bouchard *et al*, 1995). Sowohl 4-AP als auch TEA sind somit beide nicht ausschließlich als Blocker der inneren Kanalpore anzusehen (Claydon *et al*, 2007; Yao & Tseng, 1994).

#### 1.2.3.5 Anwendung des Blockers 4-AP

Sowohl TEA als auch 4-AP werden experimentell zur Blockade von Kv-Kanälen genutzt. Sie werden eingesetzt um verschiedene Kv-Ströme in nativen Geweben elektrophysiologisch zu isolieren. So sind die meisten Kv1-Kanäle hochaffin für 4-AP und ihre  $IC_{50}$ -Werte liegen im Bereich zwischen 10  $\mu$ M und 600  $\mu$ M, während ein Großteil der Kv2-, Kv3- und Kv4-Kanäle  $IC_{50}$ -Werte für 4-AP im millimolaren Bereich aufweisen (Gutman *et al*, 2005). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber Blockern kann zwischen einzelnen Kv-Familien unterschieden werden (Nguyen *et al*, 1994; Shieh & Kirsch, 1994). 4-AP wird zudem klinisch eingesetzt: Seit 2010 ist es unter dem Namen Ampyra® in den USA, und seit September 2011 als retard Präparat unter dem Namen Fampyra® auch in Deutschland, zur Behandlung von Gehbeschwerden bei Patienten mit Multipler Sklerose (MS) zugelassen. MS ist eine Erkrankung des zentralen Nervensystems, bei der vermutlich aufgrund von Autoimmunreaktionen die Myelinscheiden neuronaler Fortsätze abgebaut werden. Physiologisch umgeben Myelinscheiden Membranabschnitte neuronaler Fortsätze und

dienen der elektrischen Isolation dieser Bereiche. Aktionspotentiale entstehen nur in den Bereichen zwischen den Myelinscheiden, die als Ranvier'sche Schnürringe bezeichnet werden (saltatorische Erregungsleitung). Dies ermöglicht eine schnelle Weiterleitung der Erregung innerhalb der neuronalen Fortsätze. Bei Demyelinisierung liegen Kv-Kanäle frei, die sonst unter der Myelinscheide verborgen sind. Zudem ändert sich die Lokalisation der Kv-Kanäle innerhalb des Fortsatzes (Judge & Bever, 2006). Es entsteht eine größere Kaliumleitfähigkeit und die saltatorische Erregung ist gestört, was die Effektivität der Aktionspotentialweiterleitung mindert. Die Symptome der Erkrankung hängen davon ab, welcher Teil des zentralen Nervensystems betroffen ist und reichen von Sensibilitäts- und Sehstörungen bis hin zu Ataxien (Störungen der Bewegungsabläufe) und Spastiken. 4-AP wird hauptsächlich zur Linderung von Gangataxien eingesetzt. Sein therapeutischer Nutzen wird dabei der Blockade von Kv-Kanälen im Bereich demyelinisierter neuronaler Fasern zugeschrieben (Barten *et al*, 2010).

#### 1.2.3.6 Regulation von Kaliumkanälen durch ungesättigte Fettsäuren und ihnen verwandte Substanzen

Die Membranen eukaryotischer Zellen bestehen aus verschiedenen Phospholipiden. Diese bestehen aus Glycerin, welches mit Fettsäuren und Phosphorsäure verestert ist. Die drei Hydroxylgruppen des Glycerins werden mit sn-1, sn-2 und sn-3 bezeichnet (sn steht für die stereospezifische Nummerierung). Die Hydroxylgruppe an Position sn-3 ist mit Phosphorsäure verestert, an den anderen beiden Positionen befinden sich Fettsäuren. Die langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure (AA) befindet sich häufig an der Position sn-2 von Phospholipiden. Die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) hydrolysiert die Acyl-Gruppe an der Position sn-2 und setzt somit Arachidonsäure frei (Gijón & Leslie, 1999). Es gibt mehrere strukturell unterschiedliche Formen von PLA<sub>2</sub>-Enzymen, die sich in ihrem Expressionsmuster und in der Regulation ihrer Aktivität unterscheiden. Sie können grob in Calcium-abhängige und Calcium-unabhängige, sowie in zytosolische und sekretorische PLA<sub>2</sub>-Enzyme unterteilt werden. Die ubiquitär exprimierte cPLA<sub>2</sub> (engl.: „cytosolic PLA<sub>2</sub>“) scheint eines der Hauptenzyme für die Freisetzung von Arachidonsäure als Antwort auf Zellstimulation zu sein. Sie wird durch Phosphorylierung aktiviert und durch erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Level an die Zielmembran rekrutiert (Seeds *et al*, 1999). Eine weitere Calcium-abhängige Form ist die sPLA<sub>2</sub> (engl.: „secretory PLA<sub>2</sub>“), welche extrazellulär wirkt. Die Calcium-unabhängige iPLA<sub>2</sub> (engl.: „independent PLA<sub>2</sub>“) wurde in Makrophagen entdeckt. Sie ist vermutlich konstitutiv aktiv, gewährleistet ein konstantes Level an freien Fettsäuren und reguliert die Verfügbarkeit von Arachidonsäure (Seeds *et al*, 1999). Der

Arachidonsäurehaushalt der Zelle wird somit multifaktoriell reguliert. Verschiedene endogene und synthetische Substanzen, die der Arachidonsäure ähneln, sind physiologisch beziehungsweise experimentell von Bedeutung.

Docosahexaensäure (DHA) ist ebenso wie Arachidonsäure eine endogene Fettsäure und Hauptbestandteil der Membranphospholipide. Das Ethanolamid der Arachidonsäure, Anandamid (N-arachidonyl-ethanolamin; AEA), wird wie Arachidonsäure und DHA aus neuronalen Membranen durch die Aktivierung von Phospholipasen freigesetzt. Die Phospholipid-Vorstufe des Anandamid stellt das N-arachidonyl-phosphatidylethanolamin (NAPE) dar (Di Marzo *et al*, 1994). Durch Aktivierung einer NAPE-hydrolysierenden Phospholipase (NAPE-PLD) wird Anandamid abgespalten. Es gibt jedoch auch alternative, NAPE-PLD unabhängige Wege der Anandamidfreisetzung (Okamoto *et al*, 2009). Freies Anandamid kann die Zellmembran passieren und extrazellulär die Cannabinoid-Rezeptoren vom Typ 1 (CB1-Rezeptoren) benachbarter Zellen aktivieren, es zählt somit zu den endogenen Cannabinoiden.

Eicosatetraensäure (ETYA) ist ein synthetisches Analogon der Arachidonsäure, welches durch die Abbauege der Arachidonsäure in der Zelle jedoch nicht metabolisiert wird. ETYA ist daher stabiler als Arachidonsäure und wird experimentell zur Inhibition des Arachidonsäuremetabolismus, sozusagen als „falsches Substrat“, und generell zur Untersuchung der Effekte von langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (HUFAs) genutzt (Tobias & Hamilton, 1979; Keller *et al*, 1993).

Fettsäuren wurden schon mehrfach mit der Regulation von Ionenkanälen in Zusammenhang gebracht. So werden TRAAK- und TREK-Kanäle, welche zur Familie der  $K_2P$ -Kanäle (Zwei-Porendomänen Kaliumkanäle) gehören, durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure aktiviert, jedoch nicht durch gesättigte Fettsäuren (Franks & Honoré, 2004; Fink *et al*, 1998). Kv-Kanäle werden durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren hingegen inhibiert (Honoré *et al*, 1994; Boland *et al*, 2009). Dies trifft sowohl auf Kanäle mit A-Typ Kinetik als auch auf ‚delayed rectifier‘ Kv-Kanäle zu (Oliver *et al*, 2004). Anandamid, DHA und ETYA zeigen in Bezug auf die Regulation der Kaliumkanäle meist ein ähnliches Verhalten wie Arachidonsäure selbst (Oliver *et al*, 2004; Boland *et al*, 2009). Der Mechanismus der Inhibition von Kv-Kanälen durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren wird derzeit diskutiert.

## 1.3 RNA Editierung

Das Phänomen der RNA Editierung wurde erstmals 1986 für ein mitochondriales Protein in parasitären Protozoen der Gattung *Trypanosoma* beschrieben (Benne *et al.*, 1986). Die Gruppe von Benne beschreibt eine Insertion zusätzlicher Basen auf prä-mRNA-Ebene, die in der DNA-Sequenz des entsprechenden Gens nicht kodiert sind. Seither wurden verschiedene Formen von Sequenzvarianten auf RNA-Ebene beschrieben. So werden mittlerweile Modifikationen, Deletionen oder Insertionen von mehreren oder einzelnen RNA-Basen innerhalb eines prä-mRNA Moleküls unter dem Überbegriff RNA Editierung zusammengefasst (Maydanovych & Beal, 2006). Diese Editierungsprozesse werden von spezifischen Enzymen katalysiert und tragen zur Diversifizierung des Proteinpools in Protozoen und Metazoen bei. Die physiologischen Funktionen der RNA Editierung sind vielseitig. Vor allem neuronale Prozesse scheinen entscheidend durch RNA Editierungsprozesse beeinflusst zu werden, da eine Vielzahl neuronal exprimierter Proteine einer RNA Editierung unterliegt. Auch die evolutionäre bzw. phylogenetische Konservierung bestimmter RNA Editierungsstellen neuronaler Proteine in verschiedenen Organismen deutet auf eine wichtige Funktion dieser Editierungen für die Organismen hin (Hoopengardner *et al.*, 2003).

### 1.3.1 Basenmodifikation durch ADARs und CDARs

In höheren Eukaryonten ist die Basenmodifikation die vorherrschende Form der RNA Editierung (Maas & Rich, 2000). Eine Basenmodifikation kann beispielsweise in einer

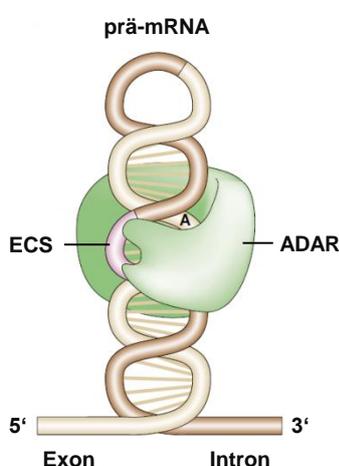


Abb. 1.4: **Schema eines RNA Editierungskomplexes.** Im hier gezeigten Beispiel ist die Editierungsstelle im Exon der prä-mRNA gelegen. Im Intron gibt es einen Bereich, der zur Editierungsregion komplementär ist, die ECS. Zwischen ECS (rosa) und Editierungsstelle bildet sich eine doppelsträngige Haarnadelstruktur aus, die durch das ADAR-Enzym erkannt wird. Abbildung modifiziert nach Keegan *et al.*, 2001.

hydrolytischen Abspaltung von Aminogruppen bestehen. Dies verändert die Identität der kodierenden RNA-Base. Es wurden verschiedene Familien von Editierungsenzymen identifiziert. Die Familie der CDARs (engl.: „cytidine desaminases acting on RNA“) katalysiert die Desaminierung von Cytidinen (C) zu Uridinen (U), während die Familie der

ADARs (engl.: adenosine desaminases acting on RNA) die Desaminierung von Adenosinen (A) zu Inosinen (I) katalysiert. Auch Adenosine in tRNA (Transfer-RNA) können editiert werden, dazu dienen sogenannte ADATs (engl.: „adenosine desaminases acting on tRNA“).

Die RNA Editierung von Adenosinen durch ADARs stellt einen in höheren Eukaryonten häufig beobachteten Rekodierungsmechanismus dar (Maas, 2010). Das entstehende Inosin ist eine seltene RNA-Base und wird von der Translationsmaschinerie als Guanosin (G) interpretiert. Somit führt diese Editierung funktionell zu einem Austausch von A nach G in der entsprechenden mRNA. Die Spezifität der enzymatischen Editierung beruht weniger auf der Sequenz des prä-mRNA Moleküls, als auf der Sekundärstruktur, die die prä-mRNA ausbildet. ADAR Enzyme erkennen doppelsträngige Bereiche in prä-mRNAs, die sich zwischen der exonischen Editierungsstelle und einem zur Editierungsstelle komplementären RNA-Abschnitt, auch ECS (engl.: „editing complementary sequence“) genannt, ausbilden (Higuchi *et al*, 1993). Die ECS befindet sich meist in einem intronischen Bereich (Abb. 1.4). Die Editierungsstelle kann auch in intronischen oder untranslatierten Bereichen der mRNA liegen und dort die Regulation von Spleißvorgängen beeinflussen oder die mRNA Stabilität modulieren (Rueter *et al*, 1999; Wang *et al*, 2004). Editierungen, die in exonischen Bereichen stattfinden, führen hingegen meist auch zu einer Änderung der Bedeutung des betroffenen Codons, sodass bei der Translation eine andere Aminosäure in die Peptidkette eingebaut wird, als genomisch kodiert ist.

### 1.3.2 Die Familie der ADAR Enzyme

In Vertebraten wurden drei Gene kloniert, die für ADAR Enzyme kodieren (ADAR1-3) (Maas *et al*, 2003). Alle drei Mitglieder der ADAR-Familie weisen sowohl Bindedomänen für doppelsträngige RNA als auch eine Deaminasedomäne auf. Die ADAR3 weist zusätzlich eine Einzelstrang-RNA Bindedomäne auf (Chen *et al*, 2000). ADAR1 und ADAR2 sind nahezu ubiquitär im Organismus exprimiert, unter anderem stark im Gehirn (Wagner *et al*, 1990), während die ADAR3 ausschließlich in bestimmten Hirnregionen exprimiert wird (Chen *et al*, 2000). Des Weiteren unterscheiden sich die drei ADAR Enzyme in ihren Substratspezifitäten. ADAR1 und ADAR2 weisen einen unterschiedlichen, aber teilweise überlappenden Substratpool auf, während für ADAR3 bisher keine Editierungsaktivität für bekannte Editierungssubstrate nachgewiesen werden konnte (Chen *et al*, 2000). Die Funktion der ADAR3 wird daher noch diskutiert.

### 1.3.3 Neuronale Zielproteine der RNA Editierung durch ADAR Enzyme

Zu den bisher identifizierten neuronalen Zielen der ADAR Enzyme im Menschen gehören u.a. die GluR-B Untereinheit des ionotropen AMPA-Rezeptors, der metabotrope 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor und die  $\alpha$ -Untereinheit des Kv1.1-Kanals (Sommer *et al*, 1991; Burns *et al*, 1997; Hoopengardner *et al*, 2003). Die funktionellen Folgen der GluR-B Editierung und der 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor Editierung sind relativ gut bekannt (Streit & Decher, 2011).

#### 1.3.3.1 Editierung der GluR-B Untereinheit an der Q/R Stelle

Die GluR-B Untereinheit erfährt durch die RNA Editierung einen Aminosäureaustausch von Glutamin (Q) zu Arginin (R) in ihrer zweiten Transmembrandomäne (TM2), welche an der Bildung der Kanalpore beteiligt ist und somit Einfluss auf den Ionenfluss hat (Abb. 1.5 A). Die Editierungsstelle wird als Q/R Stelle bezeichnet. Funktionelle AMPA-Rezeptoren sind Tetramere, die sich aus verschiedenen Kombinationen der Untereinheiten GluR-A, GluR-B, GluR-C und GluR-D zusammensetzen können. Während alle AMPA-Rezeptoren eine Na<sup>+</sup>-Leitfähigkeit aufweisen, wird die Leitfähigkeit der Rezeptoren für Ca<sup>2+</sup> maßgeblich durch das Vorhandensein von GluR-B Untereinheiten im Tetramer und durch deren Editierungsstatus an der Q/R Stelle bestimmt (Burnashev *et al*, 1992). Enthält ein Rezeptortetramer editierte GluR-B Untereinheiten (GluR-B (R)), so ist es impermeabel für Ca<sup>2+</sup>-Ionen.

Sind die vorhandenen GluR-B Untereinheiten an der Q/R Stelle nicht editiert (GluR-B (Q)) oder sind keine GluR-B Untereinheiten im Tetramer vorhanden, so kann die Pore Ca<sup>2+</sup>-Ionen leiten. Wahrscheinlich enthält ein Großteil der AMPA-Rezeptoren GluR-B Untereinheiten, da diese Untereinheit zu den stark exprimierten GluR-Untereinheiten gehört (Pellegrini-Giampietro *et al*, 1992). Die Editierungsrate der GluR-B Untereinheiten ist vom ontogenetischen Entwicklungsstatus abhängig. Im adulten Hirn liegen unter physiologischen Bedingungen über 99 % aller GluR-B Untereinheiten in editierter Form vor, weshalb dort die AMPA-Rezeptoren impermeabel für Ca<sup>2+</sup> sind (Pellegrini-Giampietro *et al*, 1992; Sommer *et al*, 1991). Studien, bei denen das ADAR2-Enzym in Mäusen aufgrund eines genetischen Knock-outs fehlt, haben gezeigt, dass diese Editierung der GluR-B prä-mRNA unerlässlich für die normale neuronale Entwicklung und für das Überleben des Organismus ist (Higuchi *et al*, 2000; Brusa *et al*, 1995). Neben der Regulation der Ionenselektivität hat die RNA Editierung der Q/R Stelle ebenfalls Einfluss auf die Pharmakologie der AMPA-Rezeptoren (Streit & Decher, 2011). Während endogene Blockersubstanzen wie Spermin und Spermidin

und das Joro-Spinnentoxin (JSTX) nur AMPA-Rezeptoren ohne editierte GluR-B Untereinheiten blockieren, kann die endogene Fettsäure Arachidonsäure (AA) nur solche AMPA-Rezeptoren blockieren, welche editierte Untereinheiten enthalten (Abb. 1.5 B und C).

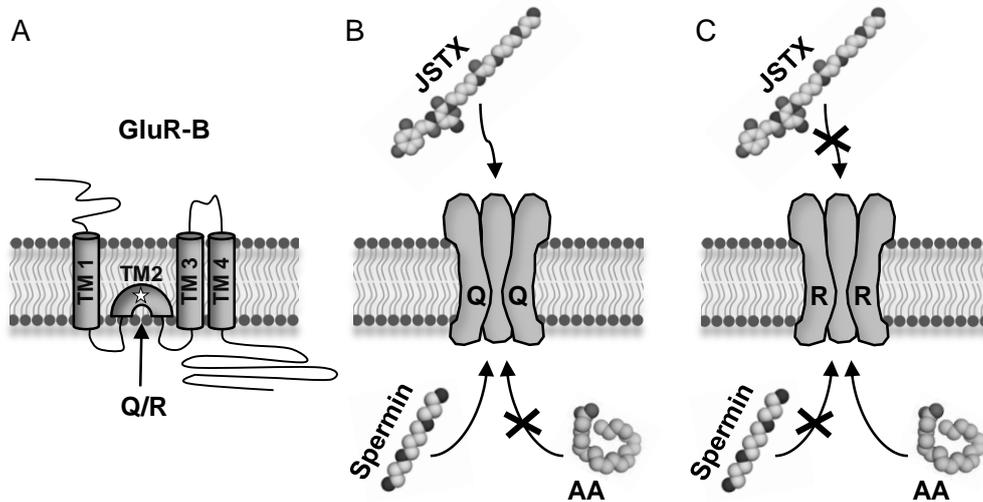


Abb. 1.5: **Die RNA Editierung der GluR-B Untereinheit des AMPA-Rezeptors beeinflusst dessen Pharmakologie.** **A)** RNA Editierung der GluR-B Untereinheit führt zu einem Aminosäureaustausch von Glutamin (Q) nach Arginin (R) innerhalb der zweiten Transmembrandomäne (siehe Stern). Die Q/R Editierungsstelle befindet sich im porenbildenden Bereich des AMPA-Rezeptors und nimmt Einfluss auf dessen Pharmakologie. **B)** Rezeptoren, welche aus nicht editierten Untereinheiten bestehen, werden durch intrazelluläres Spermin sowie durch extrazellulär verabreichtes Joro-Spinnentoxin (JSTX) blockiert, sind jedoch gegenüber Blockade durch Arachidonsäure (AA) resistent. **C)** Rezeptoren, welche editierte Untereinheiten enthalten, sind insensitive gegenüber Spermin und JSTX, werden jedoch durch AA blockiert.

Verminderte Editierungslevel der GluR-B Untereinheiten in Motoneuronen wurden bei Patienten mit sporadischer Amyotropher Lateralsklerose (sALS) beobachtet. Der dadurch verursachte erhöhte  $Ca^{2+}$ -Einstrom wirkt exzitotoxisch und wird daher mit dem für diese Erkrankung charakteristischen Absterben der Motoneuronen in Verbindung gebracht, was die pathophysiologische Bedeutung der GluR-B Editierung verdeutlicht (Kawahara *et al*, 2004).

### 1.3.3.2 RNA Editierung des 5HT<sub>2C</sub>-Rezeptors an multiplen Stellen

Ein weiteres prominentes Beispiel für die funktionelle Relevanz der RNA Editierung neuronaler Proteine ist der metabotrope Serotonin-Rezeptor 5HT<sub>2C</sub>. Die RNA dieses Rezeptors kann an fünf möglichen Stellen editiert werden, die sich auf drei Codons verteilen. Die drei betroffenen Aminosäurepositionen befinden sich alle in der zweiten intrazellulären Domäne. Je nach Editierungsmuster des mRNA-Moleküls können 24 verschiedene Isoformen (durch Kombination verschiedener Aminosäuren an den drei von der Editierung

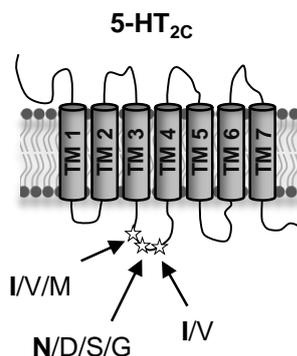


Abb. 1.6: **Der Serotonin-Rezeptor 5-HT<sub>2C</sub> besitzt mehrere RNA Editierungsstellen.** Es gibt fünf mögliche Editierungsstellen, die auf drei Codons der 5-HT<sub>2C</sub>-mRNA verteilt sind. Die betroffenen Aminosäurepositionen (siehe Sterne) befinden sich alle in der zweiten intrazellulären Schleife des Kanals, die an der Bindung der G-Proteine beteiligt ist. An jeder Position können je nach Editierungsmuster verschiedene Aminosäurereste auftreten (die Beschriftung folgt dem Einbuchstaben-Code).

betroffenen Positionen) entstehen (Abb. 1.6). In humanen Hirnproben konnten bisher 20 dieser Isoformen nachgewiesen werden (Fitzgerald *et al*, 1999; Burns *et al*, 1997; Dracheva *et al*, 2003). Der 5HT<sub>2C</sub>-Rezeptor kann zwei verschiedene Signalkaskaden aktivieren: Zum einen ist er ein G<sub>q</sub>

gekoppelter Rezeptor, sodass der PLC-IP<sub>3</sub> Signalweg aktiviert wird. Die drei Aminosäurepositionen, die der Editierung unterliegen, befinden sich in dem intrazellulären Bereich, an den G<sub>q</sub>-Proteine bei Aktivierung des Rezeptors binden. Zum anderen kann über eine bisher unbekannt Kaskade der PLA<sub>2</sub>-AA Weg aktiviert werden. Der 5HT<sub>2C</sub>-Rezeptor kann außerdem durch verschiedene Agonisten aktiviert werden. Welcher Signalweg dabei vorwiegend aktiviert wird, hängt davon ab, welcher Agonist an den Rezeptor bindet. Dieses Phänomen wird als Agonist-gesteuertes Handeln des Rezeptor-Stimulus (engl.: „agonist-directed trafficking of receptor stimulus“; ADTRS) bezeichnet. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass das Editierungsmuster regulierend auf das ADTRS wirkt. So zeigen vollständig editierte Rezeptoren beispielsweise keine Präferenz für einen der beiden Signalwege, unabhängig vom aktivierenden Agonisten (Berg *et al*, 2001).

Unabhängig von der Modulation des ADTRS wurde ferner gezeigt, dass Agonisten an editierten Rezeptoren eine geringere Aktivierungspotenz aufweisen. Dies ist sowohl auf eine geringe Affinitäten der editierten Rezeptoren für die Liganden als auch für die G-Proteine zurückzuführen (Herrick-Davis *et al*, 1999). Es wird allgemein angenommen, dass das neuronale serotonerge System an der Regulation der Stimmung beteiligt ist. Einige Studien haben bereits Hinweise darauf geliefert, dass veränderte Editierungsraten des 5HT<sub>2C</sub>-Rezeptors mit bestimmten psychiatrischen Erkrankungen oder Symptomen korrelieren könnten. So wurde unter anderem ein allgemeiner Trend zu erhöhten Editierungsraten des 5HT<sub>2C</sub>-Rezeptors bei Suizidopfern festgestellt (Iwamoto *et al*, 2009; Gardiner & Du, 2006).

### 1.3.4 RNA Editierung des humanen Kv1.1-Kanals

Ein relativ neu entdecktes Ziel neuronaler humaner RNA Editierung ist die  $\alpha$ -Untereinheit des Kv1.1-Kanals (Hoopengardner *et al*, 2003). Die intronlose prä-mRNA des Kanals wird innerhalb einer exonischen Haarnadelstruktur an einem einzelnen Adenosin durch das Enzym ADAR2 editiert. Diese Editierung hat einen Aminosäureaustausch an Position 400 von Isoleucin (I) zu Valin (V) im S6-Segment der Kanaluntereinheit zur Folge (Abb. 1.7). Die S6-Segmente der einzelnen  $\alpha$ -Untereinheiten sind an der Bildung der zentralen Pore des funktionellen Kanaltetramers beteiligt.

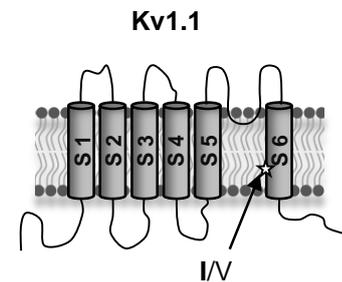


Abb. 1.7: **RNA Editierung des Kv1.1-Kanals.** Der humane Kv1.1-Kanal unterliegt einer Editierung, die zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin (I) zu Valin (V) in der Mitte des S6-Segmentes führt (siehe Stern). Das S6-Segment ist an der Bildung der inneren Porenwand beteiligt.

Eine bisher beschriebene Folge dieser Editierung ist eine verringerte Affinität der Kanalpore für den Inaktivierungspartikel der Kv $\beta$ 1.1-Untereinheit, welche sich in einer beschleunigten Erholung von der Inaktivierung widerspiegelt (Bhalla *et al*, 2004). Über eventuelle weitere Auswirkungen der I400V Editierung des Kv1.1-Kanals ist bisher nur wenig bekannt. Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass editierte Kanäle einen geringeren Ganzzellstrom aufweisen. Dazu wurde in *Xenopus* Oozyten die Stromgröße von Kv1.1- und I400V-Kanälen untersucht. Bei gleichen Expressionsbedingungen (gleiche cRNA-Mengen an Kv1.1 und I400V, zeitgleich injiziert und gemessen) wurde die Größe der Ganzzellströme am zweiten Tag nach der Injektion gemessen. Die Ströme der editierten Kanäle zeigten im Mittel nur  $\sim 40\%$  der Stromgröße, die für nicht editierte Kanäle erreicht wurde (Abb. 1.8) (Streit, 2008). Die molekularen Hintergründe dieses Stromgrößenunterschieds wurden bisher nicht untersucht.

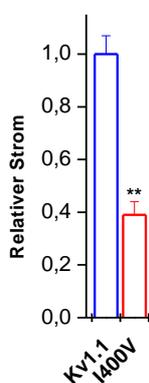


Abb. 1.8: **Editerte Kv1.1-Kanäle zeigen eine reduzierte Stromgröße in *Xenopus* Oozyten.** Der Vergleich der Stromgrößen von nicht editierten (Kv1.1) und editierten (I400V) Kv1.1-Kanälen zeigt, dass die Editierung eine Reduktion des Stromes um  $61 \pm 5\%$  bewirkt. Zur Bestimmung der Stromgrößen wurden gleiche Mengen an Kv1.1 und I400V-cRNA zeitgleich in *Xenopus* Oozyten injiziert. Nach 48 h Expressionszeit wurden die Stromgrößen in TEVC-Messungen bei einem depolarisierenden Potential von  $+40$  mV bestimmt (Streit, 2008).

Desweiteren habe ich in meiner Diplomarbeit begonnen, die Pharmakologie der editierten Kv1.1-Kanäle zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass die I400V Editierung die Sensitivität der Kanäle gegenüber verschiedenen Blockersubstanzen stark herabsetzt. Zu den Blockern

mit verringerter Wirkung bei editierten Kanälen zählen u.a. Psora-4 und 4-AP. Auch die durch Arachidonsäure induzierte Inaktivierung wird durch die I400V Editierung aufgehoben. Letzteres war anhand der bisher postulierten Mechanismen der Arachidonsäurewirkung ein eher unerwartetes Ergebnis (Streit, 2008).

Initial wurde angenommen, dass Arachidonsäure in der Membran vorliegt und durch eine Interaktion mit dem Selektivitätsfilter des Kanals eine Inaktivierung auslöst (Oliver *et al*, 2004). Somit wäre kein direkter Kontakt mit der zentralen Kanalpore für die Wirkung der Arachidonsäure von Nöten. Die Beobachtung, dass die I400V Editierung die Arachidonsäure-Wirkung aufhebt (Streit, 2008), stellte den bisher angenommenen Mechanismus der Stromreduktion von Arachidonsäure in Frage, da die editierte Aminosäure in der Mitte des porenbildenden S6-Segment lokalisiert ist und nicht Teil des Selektivitätsfilters ist. Die Sequenz der inneren Pore aller Kv1-Kanäle ist identisch und somit auch die Bindungsstelle für Porenblocker. Die Bedeutung der editierten Aminosäureposition für die Wirkung der Arachidonsäure wurde durch Mutation der homologen Stelle im Kv1.5-Kanal (I508A) bestätigt (Streit, 2008). Zudem wurden durch systematische Mutationen im S6-Segment des Kv1.5-Kanals fünf weitere Aminosäuren identifiziert, deren Mutation zu Alanin die Wirkung der Arachidonsäure vermindert (I502, V505, V512, P513 und V516) (Streit, 2008). I508 entspricht der Editierungsstelle I400 im Kv1.1-Kanal. Der Abstand von 3-4 Positionen zwischen den einzelnen Aminosäuren lässt darauf schließen, dass sie auf der gleichen Seite der Helix liegen. Der genaue Blockmechanismus blieb bisher ungeklärt.

## 1.4 Zielsetzung

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Aspekte der physiologischen und pharmakologischen Regulation von Kv1-Kanälen untersucht werden. Dazu sollten hauptsächlich verschiedene elektrophysiologische und molekularbiologische Methoden, sowie Fluoreszenzmikroskopie genutzt werden.

Ein Ziel bestand in der Aufklärung des Mechanismus der durch endogene mehrfach ungesättigte Fettsäuren und verwandte Substanzen induzierten Inaktivierung von Kv-Kanälen. Die in meiner Diplomarbeit aufgestellte Hypothese, dass die endogene Fettsäure Arachidonsäure in der inneren Kanalpore bindet und somit als Porenblocker dient, sollte überprüft werden.

Ein weiteres Ziel bestand darin, die Folgen der RNA Editierung des Kv1.1-Kanals zu analysieren. Zunächst sollte eine pharmakologische Charakterisierung erfolgen, bei der verschiedene endogene und synthetische Blockersubstanzen sowie Toxine bezüglich ihrer Wirksamkeit gegenüber nicht editierten und editierten Kv1.1-Kanälen getestet werden. Dies sollte Aufschluss über die physiologische und pharmakologische Relevanz der Kv1.1 Editierung geben. Anschließend sollte eine Charakterisierung der editierten Kv1.1-Kanäle erfolgen, bei der die molekulare Grundlage für die zuvor beobachtete Reduktion des Ganzzellstromes editierter Kv1.1-Kanäle aufgeklärt werden sollte.

Zur Untersuchung pathophysiologischer Aspekte der Kv1.1-Editierung stand ein Tiermodell für Epilepsie zur Verfügung, dessen chronisch epileptischen Tiere eine veränderte Pharmakologie aufweisen, die bisher nicht erklärt werden konnte. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte daher die Kv1.1-Editierungsrate der epileptischen und gesunden Tiere im entorhinalen Cortex verglichen werden. Das Ziel bestand darin, zu klären ob eine veränderte Kv1.1-Editierungsrate die unterschiedliche Pharmakologie epileptischer und gesunder Tiere erklären kann.

Neben den Aspekten der Pharmakologie und Kv1.1-Editierung stellte ebenfalls die Untersuchung der A-Typ Inaktivierung durch die Kv $\beta$ 1.3-Untereinheit einen Teilaspekt der Arbeit dar. Hier wurde die Aufklärung der Konformation des Inaktivierungspartikels der Kv $\beta$ 1.3-Untereinheit angestrebt.

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Molekularbiologie

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Zur DNA-Vermehrung wurden *Escherichia coli* Zellen des Stammes DH5 $\alpha$  (Genotyp: F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15 $\Delta$  (*lacZYAargF*) U169*deoRrecA1endA1hsdR17* (*r<sub>k</sub>,m<sub>k</sub>*<sup>+</sup>) *phoA**supE44thi1gyrA96relA1* $\lambda$ ) der Firma Invitrogen verwendet. Diese Zellen sind durch chemische Vorbehandlung seitens des Herstellers kompetent für DNA-Transformationen mittels Hitzeschock (siehe 2.1.3).

Plasmide mit niedriger Transformationseffizienz wurden mittels Elektroporation in Bakterien eingebracht (siehe 2.1.4). Dazu wurden elektrokompente XL1-Blue MRF<sup>-</sup>-Zellen (Stratagene) verwendet. Diese besitzen folgenden Genotyp:  $\Delta$ (*mcrA*)183  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F<sup>-</sup> *proAB lacI<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15Tn10 (Tet<sup>r</sup>)].

#### 2.1.2 Antibiotika

Alle verwendeten Plasmide trugen ein Resistenzgen gegen Ampicillin oder Kanamycin (siehe 2.2.6). Beide Antibiotika wurden als Pulver bezogen und zur Herstellung einer Stammlösung in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Beide Stammlösungen hatten eine Konzentration von 100 mg/ml. Die Stammlösungen wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Endkonzentration der Antibiotika in LB-Medium oder LB-Agar betragen 100  $\mu$ g/ml (Ampicillin) bzw. 50  $\mu$ g/ml (Kanamycin).

#### 2.1.3 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien mittels Hitzeschock

80  $\mu$ l DH5 $\alpha$ -Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 10  $\mu$ l eines Ligationsansatzes (bzw. 10 - 100 ng einer Plasmid-DNA) zugegeben. Die Zellsuspension wurde vorsichtig mit der DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 1 min auf 37 °C

erhitzt und anschließend für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C geschüttelt.

Danach wurde für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und der entstehende Medienüberstand dekantiert. Das Bakterienpellet wurde in dem verbleibenden Medienrückstand resuspendiert und auf LB-Agarplatten (mit Antibiotikum) ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte ü.N. bei 37 °C.

#### 2.1.4 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien mittels Elektroporation

20 µl der elektrokompetenten XL1-blue MRF'-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 1-5 µl des Ligationsansatzes zugegeben. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand: 2 mm) überführt. Mittels eines Elektroporationsgeräts („MicroPulser“, BioRad) wurde ein elektrischer Puls appliziert. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium (RT) aufgenommen und 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

#### 2.1.5 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Kultivierung von *Escherichia coli* erfolgte ü.N. bei 37 °C entweder in flüssigem LB-Medium als Schüttelkultur oder ausgestrichen auf LB-Agarplatten. LB-Medium und LB-Agar wurden jeweils als Fertigpulver bezogen und nach Herstellerangaben gelöst. Zu Selektionsgründen wurde gegebenenfalls das LB-Medium bzw. die LB-Agarose vor Gebrauch mit dem zur Selektion benötigten Antibiotikum supplementiert.

#### 2.1.6 Plasmidisolierung aus Bakterien im kleinen Maßstab - Minipräparation

Von Übernachtskulturen auf LB-Agarplatten wurden einzelne Bakterienkolonien isoliert und in 2 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) bei 37 °C als Schüttelkultur ü.N. inkubiert. Die Bakterienkulturen wurden dann in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt und für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde dekantiert und verworfen. Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus den pelletierten Bakterienkulturen wurde das „Plasmid Mini

Kit I“ (E.Z.N.A.) verwendet und nach der zugehörigen Anleitung verfahren. Eluiert wurde die Plasmid-DNA in autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O.

### 2.1.7 Plasmidisolierung aus Bakterien im großen Maßstab - Midipräparation

Die Anzucht der Bakterienkolonie erfolgte wie bei der Minipräparation, mit dem Unterschied, dass die Übernachtskultur in 50 ml Medium angesetzt wurde. Die Plasmidisolierung wurde mittels des „Plasmid Midi Kit“ (QIAgen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.1.8 Positionsgerichtete Mutagenese

Alle selbst erstellten Mutationen wurden mittels PCR-basierter positionsgerichteter Mutagenese in den jeweiligen Plasmidhintergrund eingeführt. Für jede Mutation wurden spezifische Primer entworfen, die mit Hilfe von nicht-komplementären Abschnitten die gewünschte Mutation in den synthetisierten DNA-Strängen hervorrufen. Die restliche Primersequenz war komplementär zur Ausgangs-DNA und ermöglichte die Anlagerung der Primer. Alle weiteren Komponenten wurden dem Kit „QuikChange II Site-Directed Mutagenesis“ (Stratagene) entnommen und die PCR nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle PCRs wurden in einem „MJ Mini Gradient Thermal Cycler“ (Bio-Rad) durchgeführt.

### 2.1.9 Enzymatischer Verdau von DNA

Zur Linearisierung von Plasmid-DNA (als Vorbereitung der *in vitro* Transkription) oder zur Subklonierung von DNA-Fragmenten wurden Restriktionsendonukleasen verwendet. Diese erkennen und spalten spezifische Sequenzabschnitte in DNA. Alle in dieser Arbeit verwendeten Endonukleasen wurden von Fermentas oder New England Biolabs (NEB) bezogen und nach den Empfehlungen des Herstellers angewandt.

Zur Erstellung von Restriktionskarten eines Plasmids oder DNA-Fragmentes wurde die homepage „Web Map Preferences“ ([http://pga.mgh.harvard.edu/web\\_apps/web\\_map/start](http://pga.mgh.harvard.edu/web_apps/web_map/start)) genutzt.

### 2.1.10 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur Isolation einzelner DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau mit zwei oder mehr Endprodukten wurden diese durch Gelektrophorese aufgetrennt und die gewünschte Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus der Agarose extrahiert. Zur Aufreinigung eines DNA-Fragmentes nach einer Linearisierung (ein Produkt) wurde das „QIAquick Micro Spin Cycle Pure Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.1.11 *In vitro* Transkription

Die Synthese von cRNA wurde mittels der „mMESSAGE mMACHINE®-Kits“ (Ambion) durchgeführt. Je nach Vektor wurde entweder T7 oder Sp6 Polymerase verwendet. Für einen Reaktionsansatz von 15 µl wurden folgende Volumina eingesetzt:

2x dNTP/CAP (Sp6 oder T7)	7,5 µl
10x Reaktions-Puffer	1,5 µl
Linearisierte Plasmid-DNA	4,5 µl
Enzym-Mix (enthält RNA Polymerase und RNase Inhibitor)	1,5 µl

Der Transkriptionsansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein Verdau mit 1 µl TURBO DNase I (2 U/µl, ebenfalls im Kit enthalten) für 15 min bei 37 °C. Der Erfolg der cRNA-Synthese wurde mittels Gelektrophorese auf einem 1,5 %-igen Agarosegel getestet. Die cRNA-Lösung wurde bis zum Gebrauch bei - 20 °C gelagert.

### 2.1.12 Lithium-Chlorid-Präzipitation der cRNA

Die Quantifizierung synthetisierter cRNA wird durch Komponenten des Syntheseansatzes gestört (z.B. Proteine und nicht eingebaute Nukleotide). Daher wurden cRNAs vor der Quantifizierung aufgereinigt. Dazu wurde die cRNA-Lösung mit 25 µl LiCl-Präzipitationslösung (7,5 M Lithium-Chlorid, 50 mM EDTA) und 30 µl RNase freiem Wasser gemischt und für 30 min bei - 20 °C inkubiert. Ein Zentrifugationsschritt (30 min, 13000 rpm, 4 °C) diente der Pelletierung der cRNA. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 80 %-igem EtOH p.a. aufgenommen. Durch Zentrifugation für 20 min bei 13000 rpm wurde die cRNA erneut pelletiert und anschließend das EtOH vollständig entfernt. Auf diesen Waschschrift folgte die Trocknung des Pellets für ca. 5 min bei 37 °C. Das Pellet wurde in

15-20  $\mu$ l RNase freiem Wasser resuspendiert und die Qualität erneut auf einem 1,5 %-igen Agarosegel überprüft (siehe 2.2.13).

### 2.1.13 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA- oder RNA-Fragmenten wurden 1,5 %-ige Agarosegele verwendet. Zu deren Herstellung wurden 1,5 g Agarosepulver (Sigma) in 100 ml eines 1 x TAE-Puffers (Zusammensetzung: 40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach kurzer Abkühlung wurden vier Tropfen Ethidiumbromid (Konzentration: 250  $\mu$ g/ml) aus einer „dropper bottle“ (Roth) zugegeben und durch Schwenken in der Lösung verteilt. Die flüssige Agarose wurde in Gelkammern gegossen. Nach Erkalten wurden die Gele bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt.

Die Elektrophorese wurde in einer mit TAE-Puffer gefüllten Kammer durchgeführt. Die DNA- bzw. RNA-Proben wurden mit „6x DNA loading dye“ (Fermentas) gemischt und in die Geltaschen überführt. Zusätzlich wurde ein Längenstandardmarker „Lambda DNA/Eco47I (Avall)“ (Fermentas) zur Bestimmung der Fragmentgrößen aufgetragen. Zur Elektrophorese wurde für 10 bis 45 Minuten (je nach Anwendung) eine Spannung von 100 V angelegt. Anschließend wurden die Gele zur Dokumentation auf eine UV-Transluminator (BXT-20.M, UVItec) gelegt, fotografiert und ausgedruckt (DP-CF-011.C, Vilber Lourmat).

### 2.1.14 Quantifizierung von RNA und DNA

Die Konzentration von RNA- und DNA-Lösungen wurde mit Hilfe eines UV-Spektrometers („Genequant“, Pharmacia Biotech) bestimmt. Dazu wurde die Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm gemessen. Eine OD von 1 entspricht bei dieser Wellenlänge einer RNA-Konzentration von 40 ng/ $\mu$ l bzw. einer DNA-Konzentration von 50 ng/ $\mu$ l.

### 2.1.15 Quantifizierung der RNA Editierung im entorhinalen Cortex

Zur Quantifizierung der RNA-Editierung im entorhinalen Cortex von epileptischen Ratten und Kontrolltieren wurden cDNA-Proben genutzt, die mir von unserem Kollaborationspartner C. Derst zur Verfügung gestellt wurden.

Diese cDNA-Fragmente wurden zwecks Vermehrung in das Vektorsystem pGEM-T Easy (Promega) subkloniert. Dieses System hat den Vorteil, dass eine erfolgreiche Subklonierung aufgrund einer blau-weiß Selektion der Kolonien erfasst werden kann. Im „leeren“ Vektor (bei nicht erfolgreicher Subklonierung) kann durch IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid) eine Expression des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase induziert werden, welches X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid) zu 5-Brom-4-Chlor-Indoxyl spaltet, das durch Sauerstoff zu dem tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlor-Indigo oxidiert wird. Bei erfolgreicher Subklonierung wird ein cDNA-Fragment in die multiple Klonierungsstelle eingebaut, welche innerhalb des Gens für die  $\beta$ -Galaktosidase liegt. Es kann keine funktionelle  $\beta$ -Galaktosidase mehr exprimiert werden und die Blaufärbung durch IPTG und X-Gal bleibt aus.

Kolonien, die keine blaue Färbung zeigten, wurden in Schüttelkulturen kultiviert und anschließend die Plasmid-DNA isoliert. Durch Sequenzierung der Plasmid-DNA im Bereich der mutiplen Klonierungsstelle konnte quantifiziert werden, wie viele der zuvor eingebrachten cDNA-Fragmente einer I400V-Editierung unterlagen.

### 2.1.16 Sequenzierungen

Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma Seqlab durchgeführt. Die Auswertung erfolgte anhand der Programme Sequencher (Gene Codes) und ChromasLite (Technelysium).

### 2.1.17 Proteinextraktion aus *Xenopus* Oozyten

Die Expression heterolog exprimierter Ionenkanäle in *Xenopus* Oozyten wurde mit Hilfe einer Extraktion der Gesamtproteine der *Xenopus* Oozyten und anschließendem Nachweis des heterolog exprimierten Proteins mittels Western Blot untersucht. Pro untersuchtem Kanalkonstrukt wurden dazu ca. 48 h nach cRNA-Injektion (siehe unten) 20 Oozyten in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und durch Zugabe von 400  $\mu$ l TX-100 Lyse-Puffer (NaCl,

150 mM; Tris/HCl, 20 mM; Triton-X-100, 1 %; Protease Inhibitor Cocktail (Roche), 10 µl; pH 7,5) und durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert (Zuzarte *et al*, 2007). Der homogenisierte Ansatz wurde für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 4 °C bei 13000 rpm zentrifugiert. Dadurch bildeten sich drei Phasen, von denen die mittlere, klare Phase die gelösten Proteine enthielt. Diese Phase wurde abgenommen, in neue Reagiergefäße überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Die Proteinlysate wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot analysiert.

### 2.1.18 Auftrennung von Proteinen mittels SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein Trenngel mit 10 % SDS verwendet. Dieses enthielt 2,15 ml Tris-HCl (1 M, pH 8,8), 1,5 ml H<sub>2</sub>O, 1,8 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 28 µl SDS (20 %), 30 µl APS (40 %) und 12 µl TEMED. Das Sammelgel setzte sich wie folgt zusammen: 200 µl Tris-HCl (1 M, pH 6,8), 2,5 ml H<sub>2</sub>O, 488 µl Acrylamid/Bisacrylamid, 16 µl SDS (20 %), 13 µl APS (10 %) und 4,5 µl TEMED.

Von jeder Proteinlysate-Probe wurden 15 µl abgenommen und mit 3 µl 5 x Ladebuffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,125 % (w/v) Bromphenolblau) vermischt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert. Darauf folgte eine 3 minütige Zentrifugation bei 5000 rpm. Der gesamte Ansatz (18 µl) wurde dann auf das SDS-Gel überführt. Die Elektrophorese wurde zunächst für 30 min bei 30 mA (konstanter Stromfluss) und dann für weitere 60 min bei 40 mA (konstanter Stromfluss) durchgeführt.

### 2.1.19 Proteindetektion mittels Western Blot

Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte mittels der semi-dry Methode in einer Elektrophoresekammer (Biorad). Die Nitrocellulosemembran wurde in einer Blockerlösung (Roti-Block (Roth) 1:10 verdünnt in 1 x TBST (0,1 % Tween)) für 2 h bei RT inkubiert. Die Bindung des Erstantikörpers erfolgte ü.N. bei 4 °C. Danach wurde drei mal für 10 min in 1xTBST gewaschen. In der Zweitantikörper-Lösung (Antikörper 1:8000 verdünnt in 1 x TBST) wurde für 1 h inkubiert und danach erneut drei mal für 10 min in 1xTBST gewaschen. Das Lumineszenzsubstrat wurde 5 min vor Auflegen des Röntgenfilms

gleichmäßig über der Membran verteilt. Nach der Exposition wurde der Röntgenfilm entwickelt (Entwicklerlösung G150, AGFA) und fixiert (Fixierlösung G359, AGFA).

### 2.1.20 Quantifizierung der aufgetragenen Proteinmenge durch Analyse der Bandenintensitäten

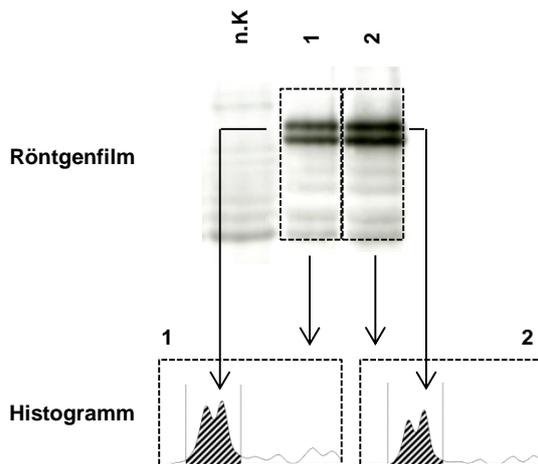


Abb. 2.1: **Prinzip der Software gestützten Analyse von Western Blot Ergebnissen.** Die entwickelten Röntgenfilme werden zunächst eingescannt und dann mittels des Programms ImageJ analysiert. In der Software werden die zu analysierenden Bereiche ausgewählt (gestrichelte Boxen oben). Das Bandenmuster wird von dem Programm in ein Amplitudenhistogramm umgewandelt (gestrichelte Boxen unten). Die Fläche unter der Kurve (schraffiert) gibt die Bandenintensität wider und wird zum Vergleich der Proteinmengen herangezogen. n.K. = negativ Kontrolle.

Zur Bestimmung der Bandenintensität wurden die entwickelten Röntgenfilme der Western Blot Analyse eingescannt und mittels des Programms ImageJ (NIH) ausgewertet. Das Programm ermöglicht die Übersetzung der Banden jeder einzelnen Spur in ein Histogramm (Abb. 2.1). Der Peak von Interesse (hier ein Doppelpeak) wird ausgewählt und die Fläche unter der Kurve (engl.: „area under the curve“; AUC) bestimmt (Abb. 2.1, schraffierter Bereich). Der Wert, der sich für die Fläche unter der Kurve ergibt, kann als Maß für die Intensität der Banden und somit für die Menge des aufgetragenen Proteins angenommen werden.

### 2.1.21 Oberflächenexpressionsanalyse in *Xenopus* Oozyten

Um die Expression heterolog exprimierter Ionenkanäle an der Plasmamembran von *Xenopus* Oozyten quantifizieren zu können, wurde zunächst ein Hämagglutinin-Epitop mittels positionsgerichteter Mutagenese (siehe 2.1.8) in den extrazellulären Kanalbereich eingebracht. Ca. 48 h nach Injektion der Kanal-cRNA wurden die Oozyten dem folgenden Protokoll unterzogen: Pro Konstrukt wurden ca. 30 Oozyten in einem Rundbodenröhrchen (5 ml, 75x12 mm, Sarstedt) in 400 µl Blockierlösung (ND96 versetzt mit 1 % Albumin

Fraktion V (Roth)) für 30 min auf Eis inkubiert. Die Blockierlösung wurde anschließend vollständig abgenommen und die Oozyten in 200 µl Erstantikörperlösung (Ratte Anti-HA-Antikörper (Roche) 1:100 verdünnt in Blockierlösung) aufgenommen. In dieser Lösung wurde für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend folgten, über 30 min verteilt, sechs Waschschrte in je ca. 2 ml Blockierlösung. Diese Schritte wurden in 24-well Platten (Sartstedt) auf Eis durchgeführt. Danach wurden die Oozyten erneut in Rundbodenröhrchen überführt und in 200 µl der Zweitantikörperlösung (Ziege Anti-Ratte-IgG-Antikörper, Meerrettich-Peroxidase (engl.: „horseradish peroxidase“; HRP) gekoppelt (Dianova), 1:500 verdünnt in Blockierlösung) für 1 h auf Eis inkubiert. Darauf folgte erneut ein Waschschrte in 24-well Platten, hier jedoch 12 Waschschrte verteilt auf 60 min (siehe oben). Ein weiterer Waschschrte, diesmal in ND96, wurde in 6-well (6-Loch) Platten durchgeführt. Dabei wurden die Oozyten alle 15 min in ein neues well mit 5 ml ND96 überführt. Die Quantifizierung des gebundenen HRP-gekoppelten Zweitantikörpers erfolgte mittels eines Lumineszenzsubstrates (SuperSignal Femto ELISA Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific), welches durch die Peroxidase gespalten wird. Die Substratspaltung führt zu einer Lichtemission bei 425 nm (Abb. 2.2). Die Lichtemission wurde mittels eines GloMax Luminometers (Promega) gemessen. Dazu wurden die Oozyten einzeln in ein Reagiergefäß mit 20 µl des Lumineszenzsubstrates pipettiert und unverzüglich mit der Messung der Lichtemission begonnen. Die Lichtmenge wurde von dem Gerät in relativen Lichteinheiten (engl.: „relative light units“; RLU) angegeben. Für jede Oozyte wurde der maximale RLU-Wert bestimmt und als Ergebnis notiert.

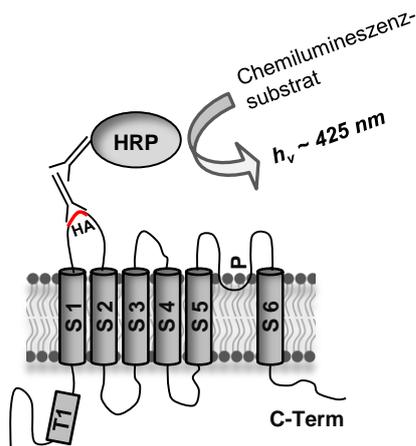


Abb. 2.2: **Funktionsprinzip der Hämagglutinin-Epitop basierten Oberflächenexpressionsanalyse.** In den extrazellulären Bereich des zu untersuchenden Proteins wird mittels Mutagenese ein Hämagglutinin-Epitop (HA) eingeführt (rot). Ein spezifischer Erstantikörper bindet an das HA-Epitop und wird selbst durch einen zweiten Antikörper erkannt, der an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist. Die HRP katalysiert die Spaltung eines Lumineszenzsubstrates, wodurch Licht ( $h_\nu$ ) bei einer Wellenlänge von 425 nm emittiert wird.

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden HEK293- und HeLa-Zellen verwendet. Aufgrund vergleichsweise geringer Expression endogener Ionenkanäle eignen sich beide Zelllinien für elektrophysiologische Untersuchungen heterolog exprimierter Kanäle. HEK293-Zellen (engl.: „human embryonic kidney“) sind humane embryonale Nierenzellen, während es sich bei HeLa-Zellen um Epithelzellen handelt, welche aus einem Zervixkarzinom isoliert wurden. Benannt wurden die Zellen nach Henrietta Lacks, der Patientin, aus der die ursprünglichen Zellen der Linie stammen. Beide Zelllinien sind adhärent wachsend.

### 2.2.2 Kulturbedingungen

Sowohl HEK293- als auch HeLa-Zellen wurden in D-MEM (Dulbecco's modified eagle medium, Invitrogen) kultiviert, das mit 10 % FCS (engl.: „foetal calf serum“) und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (Invitrogen) supplementiert wurde (wird im Folgenden als „Vollmedium“ bezeichnet). Die Zellen wurden in Nunclon 25 cm Kulturflaschen (Nunc) bei 37 °C in 5 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in 5 ml Vollmedium kultiviert. Je nach Konfluenz wurden die Zellen alle zwei bis fünf Tage passagiert.

### 2.2.3 Passagieren der Zellen

Zunächst wurde das Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt. Die am Flaschenboden befindlichen Zellen wurden mit 4 ml 1 x PBS gewaschen. Dann wurde der Flaschenboden mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (PAA) bedeckt, welches die Bindungen zwischen Zellen und Flaschenboden löst. Nach einminütiger Inkubation bei 37 °C ließen sich die Zellen durch leichtes Schwenken der Kulturflasche vom Boden ablösen. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 8 ml Vollmedium abgestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon überführt. Die Zellen wurden durch eine zweiminütige Zentrifugation bei 1500 rpm pelletiert. Das Pellet wurde in 3 ml Vollmedium aufgenommen und die Zellsuspension wurde auf neue Kulturflaschen bzw. -schälchen verteilt.

## 2.2.4 Aussäen von Zellen

Alle Experimente mit Kulturzellen wurden in Kulturschalen mit 35 mm Durchmesser durchgeführt. Dazu wurde ein Teil der Zellsuspension bei der Passagierung in einem größeren Volumen Vollmedium aufgenommen und dies á 2 ml pro Kulturschale verteilt. Die Zelldichte wurde dabei so gewählt, dass die Zellen in den Schalen am nächsten Tag zu 60 bis 80 % konfluent waren. Für elektrophysiologische Messungen wurden die Zellen zur Transfektion in 35 x 10 mm Nunclon-Kulturschalen (Nunc) ausgesät, für die Fluoreszenzmikroskopie wurden Glasbodenschalen mit den gleichen Maßen (WillCo) verwendet.

## 2.2.5 Transfektion

Alle Transfektionen wurden mit dem Transfektionsreagenz FuGENE6 (Roche) durchgeführt. Transfektionen wurden stets am Tag nach dem Aussäen der Zellen in die Schalen durchgeführt. Die Zellen hatten zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 60 bis 80 %. Vor Beginn der Transfektion wurde das Vollmedium in den Kulturschalen durch DMEM mit 10 % FCS (Vollmedium ohne Penicillin/Streptomycin) ersetzt. Zur Transfektion wurden zunächst pro Kulturschale 100 µl DMEM (ohne Zusätze) und 3 µl FuGENE6 in einem Eppendorfgemisch gemischt. Nach 5 min Inkubationszeit wurde diesem Ansatz die zu transfizierende DNA zugegeben und der Ansatz erneut gemischt. Nach 20 min Inkubationszeit wurden 100 µl des Transfektionsansatzes pro Kulturschale appliziert, ohne dabei die Zellen am Boden zu beschädigen.

## 2.2.6 Verwendete Plasmide

Folgende Plasmide wurden als Ausgangsprodukt für cRNA-Synthesen genutzt:

<b>cDNA/Vektor</b>	<b>Spezies</b>	<b>Resistenz</b>	<b>Restriktion senzym</b>	<b>Promotor</b>
Kv1.1/pSGEM	human	Ampicillin	<i>NheI</i>	T7
Kv1.1-I400V/pSGEM	human	Ampicillin	<i>NheI</i>	T7
Kv1.1-HA/pSGEM	human	Ampicillin	<i>NheI</i>	T7
Kv1.1-I400V-HA/pSGEM	human	Ampicillin	<i>NheI</i>	T7
Kv1.2/pGEM	Ratte	Ampicillin	<i>NheI</i>	T7
Kv1.3/pSGEM	human	Ampicillin	<i>NheI</i>	T7
Kv1.4/pXOOM	Ratte	Neomycin/Kanamycin	<i>NheI</i>	T7
Kv1.5/pSGEM	human	Ampicillin	<i>NheI</i>	T7
Kv1.6/pGEM	Ratte	Ampicillin	<i>NheI</i>	T7
Kv $\beta$ 1.3/ALMV	human	Ampicillin	<i>EcoRI</i>	SP6
Kv $\beta$ 1.3-R5K/ALMV	human	Ampicillin	<i>EcoRI</i>	SP6
Kv $\beta$ 1.3-R5C/ALMV	human	Ampicillin	<i>EcoRI</i>	SP6
Kv $\beta$ 1.3-R5Q/ALMV	human	Ampicillin	<i>EcoRI</i>	SP6
Kv $\beta$ 1.3-R5A/ALMV	human	Ampicillin	<i>EcoRI</i>	SP6
Kv $\beta$ 1.3 $\Delta$ 2-10/ALMV	human	Ampicillin	<i>EcoRI</i>	SP6

Folgende Plasmide wurden zur Transfektion von Kulturzellen verwendet:

<b>cDNA/Vektor</b>	<b>Spezies</b>	<b>Resistenz</b>
Kv1.1/pCDNA3.1	human	Ampicillin/Zeocin
Kv1.1-I400V/pCDNA3.1	human	Ampicillin/Zeocin
Kv1.4/pCDNA3.1 (+)	Ratte	Ampicillin
Kv1.1/pEGFP-C2	human	Kanamycin
Kv1.1-I400V/ pEGFP-C2	human	Kanamycin

## 2.3 Elektrophysiologie

### 2.3.1 Zusammensetzung der Lösungen

ND96-Badlösung für Messungen in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC):

NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM (pH 7.5 mit NaOH bei RT)

TEVC-Pipettenlösung:

3 M KCl

Aufbewahrungslösung für Oozyten:

1 Liter ND96 wurde mit folgenden Substanzen supplementiert: 50 mg Gentamycin, 274 mg Natrium-Pyruvat und 88 mg Theophyllin (pH 7.5 mit NaOH bei RT).

Patch-Clamp Badlösung (5 K<sup>+</sup>):

NaCl 135 mM, KCl 5 mM, HEPES 10 mM, Glucose 10 mM, MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 1mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,33 mM, CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 1 mM, Na-Pyruvat 2 mM (pH 7,4 mit NaOH bei RT)

Pipettenlösung für Whole-cell Patch-Clamp:

KCl 60 mM, K-Glutamat 65 mM, EGTA 5 mM,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  2 mM,  $K_2ATP$  3 mM,  $Na_2GTP$  0,2 mM, HEPES 5 mM (pH 7,2 mit KOH bei RT)

Blockerlösungen:

Alle verwendeten Blockersubstanzen wurden in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und in dieser Form der jeweiligen Messlösung zugefügt. Die Endkonzentration an DMSO in der Messlösung betrug stets weniger als 5 ‰.

### 2.3.2 cRNA-Injektion in *Xenopus Laevis* Oozyten

Die benötigte cRNA wurde mittels *in vitro* Transkription hergestellt (siehe oben). Die Injektion der cRNA-Lösung erfolgte mit Hilfe von Glaskapillaren („3,5" Drummond Replacement Tubes“, Drummond Scientific Company). Die Kapillaren wurden mittels eines Pipettenziehers „DMZ-Universal Puller“ (Zeitz) und durch manuelle Nachbehandlung an einer „Microforge“ (Narishige) in die gewünschte Form gebracht. Die Injektion erfolgte anhand eines „Nanoject II“ Mikroinjektors (Drummond Scientific Company). Die cRNA wurde in das Zytoplasma kurz unterhalb der Zellmembran der *Xenopus laevis* Oozyten injiziert. Pro Oozyte wurde ein Volumen von 50,6 nl injiziert.

### 2.3.3 Messungen in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC)

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Bis zur Messung wurden die Oozyten in Aufbewahrungslösung (siehe unten) bei 18 °C gelagert. Alle elektrophysiologischen Messungen an Oozyten wurden entweder mit einem „Axoclamp 900A“ Verstärker (Axon Instruments) in Kombination mit dem Analog/Digital-Wandler „Digidata 1440A“ (Axon Instruments) oder anhand eines „TurboTEC-10CD“ Verstärkers (npi) kombiniert mit einem „Digidata 1200 Series“ als Analog/Digital-Wandler (Axon Instruments) durchgeführt. Die Datenerhebung und -auswertung erfolgte mit der Software „pCLAMP“ (Molecular Devices) bzw. „ClampFit“ (Molecular Devices).

### 2.3.4 Einzelkanalmessungen in der On-cell Konfiguration

Die Einzelkanalmessungen wurden in HEK293-Zellen 24-30 h nach der Transfektion durchgeführt. Die Kv1.1- bzw. I400V-Kanal-DNA wurde in einen pCDNA3.1-Vektor subkloniert, dieser enthält keine zusätzlichen Markerproteine, sodass die Kanäle in ihrer nativen Form exprimiert werden. Pro 35 x 10 mm Nunclon-Kulturschale wurde 1 µg der Kanal-Plasmid-DNA eingesetzt. Die Transfektionseffizienz wurde anhand einer Kotransfektion von EGFP (engl.: „enhanced green fluorescent protein“) unter UV-Licht kontrolliert. EGFP wird durch das UV-Licht angeregt und emittiert Licht bei ~ 508 nm (grün). Nur homogen fluoreszierende Zellen wurden gemessen. Als Verstärker diente ein „Axopatch 200B“ (Axon Instruments) in Kombination mit einem „PCI-MIO 16-XE-10“ A/D Wandler (National Instruments). Die Datenerhebung fand mittels einer institutseigenen Software statt, welche auf dem Programmiersystem „labview“ (National Instruments) basiert (Musset *et al*, 2006). Als Bad- und Pipettenlösung diente die unter 2.3.1 beschriebene 5K<sup>+</sup>-Lösung. Die Messpipetten wurden mit einem „DMZ-Universal Puller“ (Zeitz) aus Borosilikat-Glasfilamenten „GB150F-8P“ (Science Products) gezogen. Der Pipettenwiderstand betrug ~ 10 MΩ. Durch diese hochohmigen Pipetten mit kleinem Öffnungsdurchmesser wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, einen Membranfleck zu messen, welcher nur einen einzelnen Kanal enthält. Die Abtastfrequenz (engl.: „sampling rate“) betrug 10 kHz, die Filterfrequenz des Tiefpassfilters 3 kHz.

Das Ruhemembranpotential Kv1.1- oder I400V-Kanal exprimierender Zellen betrug im Mittel ca. - 47 mV. Das transmembranäre Potential ( $\Delta\phi$ ) beschreibt die Differenz zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Potential ( $\phi_i - \phi_a = \Delta\phi$ ). Um im Bereich des gemessenen Membranflecks ein Ruhemembranpotential von - 77 mV zu erhalten wurden daher in der On-cell Konfiguration extrazellulär + 30 mV angelegt ( $(- 47 \text{ mV}_i) - (+ 30 \text{ mV}_a) = (- 77 \text{ mV})$ ). Eine Depolarisation auf + 53 mV wurde folglich durch extrazelluläres Anlegen von - 100 mV erreicht. Im Ergebnisteil wird zur Vereinfachung stets nur das errechnete transmembranäre Potential angegeben.

### 2.3.5 Ganzellstrommessungen in der Whole-cell Konfiguration

Ganzellströme wurden in HeLa-Zellen 24 - 30 h nach der Transfektion gemessen. Die transfizierten Kanalkonstrukte waren mit einem N-terminalen EGFP-Markierung versehen. Die Transfektion konnte daher anhand von UV-Licht überprüft werden. Nur fluoreszierende Zellen wurden gemessen. Bad- und Pipettenlösung sind unter 2.3.1. beschrieben. Die

Pipettenlösung wurde vor Gebrauch sterilfiltriert (Filter: Cameo 3AS, Porengröße 0,22  $\mu\text{M}$ , Fisher Scientific). Die Messungen wurden mittels eines „EPC10“ Verstärkers (HEKA) durchgeführt. Zur Datenerhebung diente das Programm „PatchMaster“ (HEKA) und zur Analyse das Programm „FitMaster“ (HEKA).

### 2.3.6 Statistische und weitere mathematische Auswertungen

Alle angegebenen Mittelwerte und Standardfehler sowie Signifikanzlevel wurden mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft) bestimmt. Zu vergleichende Datensätze wurden anhand des Student t-Tests auf signifikante Unterschiede untersucht. Dabei gilt der p-Wert als Maß für die Irrtumswahrscheinlichkeit, d.h. für die Wahrscheinlichkeit, dass die untersuchten Datensätze der gleichen Population entstammen. Je kleiner der p-Wert, desto größer die Signifikanz. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als Zeichen für Signifikanz festgelegt und mit einem `\*` markiert. P-Werte unter 0,01 bzw. 0,001 werden durch `\*\*` bzw. `\*\*\*` angezeigt.

Alle gezeigten Ausgleichsgeraden, die anhand von mathematischen Modellen bestimmt wurden (Hill-Funktion, Boltzmann-Kurven) und die daraus hervorgehenden Werte wurden, sofern nicht anders angegeben, mit dem Programm OriginPro7 (OriginLab Corporation) ermittelt. Dieses Programm wurden ebenfalls zur Erstellung von Abbildungen genutzt.

## 2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Mikroskopie transfizierter Zellen erfolgte mittels eines Axio Observer.Z1 Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss). Das EGFP, mit welchem die Kanäle markiert waren, konnte mit Hilfe einer UV-Lichtquelle und einem GFP-Filtersatz (Lot Nr. 38 HE, Zeiss) sichtbar gemacht werden. Als Objektiv diente ein Plan-Apochromat 60x/1.40 Oil DIC (Zeiss). Mittels einer AxioCam MRm Kamera (Zeiss) und der AxioVision Software (Zeiss) wurden die Ergebnisse aufgezeichnet.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Untersuchungen zur veränderten Pharmakologie editierter Kv1.1-Kanäle

Die editierten Kv1.1-Kanäle weisen eine verminderte Pharmakosensitivität gegenüber verschiedenen Blockersubstanzen auf, die in der offenen Kanalpore binden (Streit, 2008). Zudem sind die editierten Kv1.1-Kanäle resistent gegenüber der Inaktivierung durch die endogene Fettsäure Arachidonsäure (Streit, 2008). Ob dieses Phänomen auch bei anderen endogenen Fettsäuren oder mit ihnen verwandten Substanzen beobachtet werden kann, ist bisher unklar und wurde in den folgenden Experimenten weitergehend untersucht.

##### 3.1.1 Auswirkung der I400V Editierung auf die Stromreduktion durch endogene Fettsäuren

Zunächst wurden Kv1.1-Kanäle in nicht edierter und editierter (I400V) Form in *Xenopus* Oozyten exprimiert. Anhand von Messungen in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) konnte die Blockierbarkeit der Ströme durch verschiedene HUFAs bestimmt werden. Die HUFAs Arachidonsäure, Eicosatetraensäure (ETYA) und Docosahexaensäure (DHA) wurden mittels Badlösung in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  appliziert. Die prozentuale Abnahme des Stromes ergab sich aus dem Vergleich des Reststromes nach Applikation mit dem Ausgangsstrom vor Substanzapplikation. Der nicht editierte Kv1.1-Kanal wurde durch alle drei getesteten HUFAs stark inhibiert (Abb. 3.1 A). Bei der gegebenen Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  hatte ETYA den größten inhibitorischen Effekt ( $59 \pm 3 \%$ ), gefolgt von Arachidonsäure ( $55 \pm 4 \%$ ) und DHA ( $49 \pm 3 \%$ ). Der editierte Kanal (Kv1.1-I400V) wurde hingegen durch alle drei HUFAs gar nicht oder nur in geringem Maße blockiert (Abb. 3.1 A). Der Einfluss der Kv1.1 Editierung an der I400V Stelle ist folglich nicht auf die Wirkung der Arachidonsäure beschränkt, sondern lässt sich auch auf andere HUFAs übertragen.

### 3.1.2 Aufklärung des Blockmechanismus der HUFAs

In den folgenden Experimenten wurde der Mechanismus der Kanalinhhibition durch HUFAs und insbesondere durch Arachidonsäure detailliert untersucht.

#### 3.1.2.1 Zeitverlauf der Arachidonsäurewirkung – extrazelluläre vs. intrazelluläre Applikation

Trägt man die in TEVC-Versuchen ermittelte Reduktion des Stromes durch die HUFAs gegen die Zeit auf, so wird deutlich, dass erst nach mehr als 10 min Applikation die maximale Inhibition des Stromes erreicht wird (Abb. 3.1 B, oben). Es wurden zudem zwei weitere Substanzen getestet, die in ihrer Struktur den HUFAs ähneln: Das Lipid Anandamid (AEA) ist ein Ethanolamid der Arachidonsäure und besitzt somit den gleichen mehrfach ungesättigten hydrophoben C20-Alkylrest. Bei Applikation von Anandamid in TEVC-Messungen wurde ebenfalls eine Blockade nicht editierter Kv1.1-Kanäle beobachtet (Abb. 3.1 B, oben). VDM11 ((5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(4-Hydroxy-2-methylphenyl)-5,8,11,14-eicosatetraenamids) ist keine endogene Fettsäure, ähnelt in seiner Struktur jedoch stark

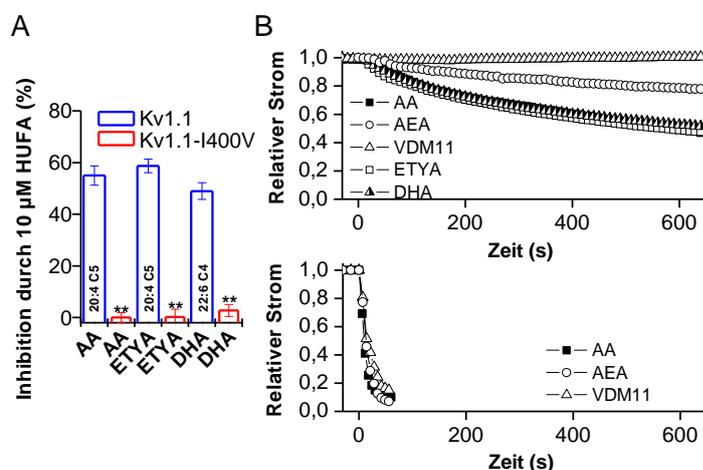


Abb. 3.1: **Inhibition von Kv1.1-Kanälen durch endogene Fettsäuren.** **A)** Inhibition von Kv1.1- und Kv1.1-I400V-Kanälen in TEVC-Messungen bei +40 mV durch extrazelluläre Applikation von HUFAs (engl.: highly unsaturated fatty acids). Arachidonsäure (AA), Eicosatetraensäure (ETYA) und Docosahexaensäure (DHA) inhibieren den Kv1.1-Kanal in einer Konzentration von 10  $\mu$ M zu  $55 \pm 4$  %,  $59 \pm 3$  % und  $49 \pm 3$  %. Der editierte Kanal (Kv1.1-I400V) wird unter gleichen Bedingungen hingegen kaum inhibiert. **B)** Bei extrazellulärer Applikation von HUFAs oder Anandamid (AEA) (oben) erreicht die Inhibition erst nach > 10 min ihr volles Ausmaß, bei intrazellulärer Applikation in Inside-out Messungen (unten) bereits nach einigen Sekunden.

Anandamid und wird experimentell als Blocker der Anandamid-Aufnahme genutzt (De Petrocellis *et al*, 2000). Die Applikation von VDM11 mit der Badlösung hatte keine Inaktivierung der Kv1.1-Ströme zur Folge (Abb. 3.1 B, oben).

Die langsame Entwicklung der Inhibition durch die unterschiedlichen HUFAs bei Applikation mit der Badlösung kann verschiedene Ursachen haben. Eine mögliche Erklärung ist, dass sich die von extrazellulär applizierten HUFAs zunächst in der Zellmembran lösen bzw. sie passieren

müssen, bevor sie in die innere Pore der Kanäle eindringen und diese blockieren können. Um diese Möglichkeit zu testen, wurde, in Kollaboration mit Prof. T. Baukowitz (Institut für Physiologie, Universität Kiel), eine Versuchsreihe in der Inside-out Makropatch Konfiguration durchgeführt. Bei dieser Messtechnik wird ein Membranfleck mit einem Durchmesser im zweistelligen Mikrometerbereich aus der Zellmembran herausgelöst und von der restlichen Zelle entfernt. In dieser Konfiguration ersetzt die Badlösung die intrazelluläre Lösung. Die Applikation von 10  $\mu$ M Arachidonsäure, AEA oder VDM11 auf der intrazellulären Seite führte innerhalb von  $\sim$  30 Sekunden zu einer fast vollständigen Inhibition der Kv1.1-Ströme (Abb. 3.1 B, unten). Das schnelle Einsetzen der Kanalinhibition in dieser Messkonfiguration spricht für einen Mechanismus, bei dem die Fettsäuren aus der intrazellulären Phase in die Kanalpore eindringen. Da AEA und VDM11 bei diesen Messungen das gleiche Ausmaß an Inhibition zeigen wie Arachidonsäure, scheint deren Penetration der Membran in der TEVC-Konfiguration der limitierende Faktor für die Ausbildung der Inhibition zu sein. Die schnelle Inhibition des Kv1.1-Stromes in den Makropatch-Messungen führte somit zu der Hypothese, dass die HUFAs und ihre Derivate bei extrazellulärer Applikation zunächst die Membran passieren und dann von innen die Kanalpore blockieren. Die durch Arachidonsäure induzierte „Inaktivierung“ wird daher im Folgenden als Blockade bezeichnet.

Zur Stützung der Hypothese, dass die K<sup>+</sup>-Strom Blockade auf einer Bindung der Lipide in der inneren Kanalpore beruht, wurden weitere Experimente durchgeführt: Zum Beispiel wurde in TEVC-Versuchen Arachidonsäure mit der Badlösung appliziert, während sich die Kanäle im geschlossenen Zustand befanden. Vor Applikation der Arachidonsäure wurden die Kanäle zunächst durch einen Spannungssprung zu + 40 mV aktiviert, um die Stromgröße ohne Substanz zu bestimmen. Danach wurde das Membranpotential der Zellen für acht Minuten auf - 80 mV gehalten, sodass die Kv-Kanäle im geschlossenen Zustand vorlagen. Während dieser Zeit wurde mit der Badlösung Arachidonsäure appliziert. Nach Ablauf der achtminütigen Einwaschphase wurden die Zellen erneut depolarisiert und somit die Kanäle aktiviert (Abb. 3.2 A). Bei diesem ersten Öffnen der Kanäle unter Arachidonsäureapplikation zeigte sich ein  $\sim$  60 %-iger Block des Kv1.1-Stromes. Das Ausmaß der Aktivierung wurde durch die Arachidonsäure dabei nicht beeinflusst, was sich in der gleichbleibenden maximalen Stromamplitude der Auswärtsströme zeigt (Abb. 3.2 A, in blau). Dieses Ergebnis deutet ebenfalls darauf hin, dass das langsame Einsetzen der Blockade unter Applikation von Arachidonsäure in Ganzzellmessungen auf der Diffusionszeit der Fettsäure durch die Zellmembran beruht. Die editierten Kanäle zeigten auch in diesem Versuch keine Blockade durch Arachidonsäure (Abb. 3.2 A, in rot).

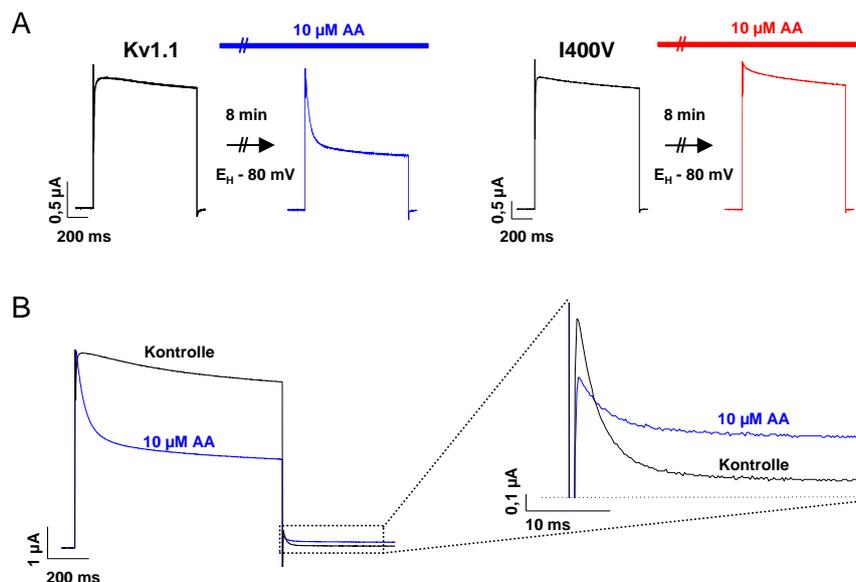


Abb. 3.2: **Arachidonsäure blockiert Kv1.1-Kanäle in der zentralen Pore.** **A)** Bei Applikation der Arachidonsäure von der extrazellulären Seite (Badlösung) wird nach einer achtminütigen Einwaschphase, in der der Kanal geschlossen bleibt (Haltepotential ist  $-80 \text{ mV}$ ), beim ersten Öffnen das volle Ausmaß des Blocks erreicht (links). Der editierte Kanal zeigt unter gleichen Bedingungen keine Blockade (rechts). **B)** Die Deaktivierung des Kv1.1-Kanals bei  $-40 \text{ mV}$  vor und nach Applikation von Arachidonsäure zeigt eine Überkreuzung der Stromverläufe (vergrößert), da die Kanäle in Anwesenheit der Arachidonsäure langsamer deaktivieren.

### 3.1.2.2 Verlangsamte Deaktivierung der Kv1.1-Kanäle unter Arachidonsäure-Applikation

Nachfolgend wurde das Schließverhalten der Kv1.1-Kanäle bei Repolarisation der Zelle in Anwesenheit der Arachidonsäure untersucht. Dies kann ebenfalls Aufschluss über den Blockmechanismus geben (siehe 1.2.3.4). Dazu wurde ein Spannungsprotokoll verwendet, bei dem auf einen depolarisierenden Spannungspuls bei  $+40 \text{ mV}$  ein Sprung zu  $-40 \text{ mV}$  folgt, bei dem die Kanäle deaktivieren (Abb. 3.2 B, links). Das Abklingen des kleinen Auswärtsstroms bei  $-40 \text{ mV}$  spiegelt das langsame Schließen der Kanäle während der Deaktivierung wider (Abb. 3.2 B, rechts). Sowohl die Amplitude dieses sogenannten Tail-Stromes als auch die Deaktivierungsgeschwindigkeit sind in Anwesenheit der Arachidonsäure verringert. Dies führt zu einer Überkreuzung (engl.: „cross over“) der Tail-Ströme, bei Vergleich der Messungen vor und nach Applikation der Substanz (Abb. 3.2 B, rechts). Dies ist charakteristisch für ein sogenanntes „Foot-in-the-door“ (zu Deutsch: Fuß-in-der-Tür) Phänomen, welches für Blocker beschrieben wurde, die in der offenen Kanalpore binden (Armstrong, 1971; Yellen, 1998; Decher *et al*, 2006). Die verringerte Amplitude des Tail-Stromes ist dabei auf den hohen Anteil der blockierten Kanäle zurückzuführen. Die

verlangsamte Deaktivierung kommt dadurch zustande, dass das Aktivierungstor bei Anwesenheit des Blockers nicht schließen kann. Der Blocker muss daher zunächst die Pore verlassen, bevor der Kanal schließen kann (siehe Abschnitt 1.2.3.4). Die hier beobachteten Veränderungen in der Deaktivierungskinetik sind demnach ein weiteres Indiz für eine Blockade des Kanals durch Binden der Arachidonsäure in der offenen Pore.

### 3.1.2.3      Kompetition von Arachidonsäure mit Tetraethylammonium um die Bindung in der Kanalpore

Ein klassischer Blocker, der in der inneren Kanalpore von Kv-Kanälen binden kann, ist Tetraethylammonium (TEA). Ein TEA-Molekül agiert dabei als Kalium-Analagon, da sein Radius dem eines hydratisierten Kaliumions ähnelt. Intrazellulär appliziertes TEA bindet tief in der Kanalpore und macht diese für Kaliumionen undurchlässig (Armstrong, 1971; Lenaeus *et al*, 2005). Um herauszufinden, ob ein Blocker in der offenen Pore bindet, kann die Kompetition des Blockers mit TEA um die Bindung in der Pore untersucht werden. Wenn intrazelluläres TEA mit der getesteten Substanz konkurriert, so ist eine Blockade der offenen Pore der wahrscheinlichste Wirkmechanismus dieser Substanz.

In Inside-out Macropatch Versuchen, die in Kollaboration mit Prof. T. Baukrowitz (Institut für Physiologie, Universität Kiel) durchgeführt wurden, wurde zunächst die Blockade von Kv1.1-Kanälen durch alleinige Applikation von 20  $\mu$ M Arachidonsäure untersucht. Die Kinetik der einsetzenden Blockade durch Arachidonsäure kann mittels einer monoexponentiellen Annäherung beschrieben werden, welche eine Zeitkonstante ( $\tau$ ) von 17 ms aufweist (Abb. 3.3 A, links). In weiteren Experimenten wurde zunächst TEA in einer Konzentration von 5 mM appliziert und die Stabilisierung des Blocks abgewartet. Dann wurde zusätzlich Arachidonsäure in einer Konzentration von 20  $\mu$ M appliziert. Dies führte zu einer deutlich langsameren Kinetik des Blocks ( $\tau = 132$  ms) als für Arachidonsäure alleine beobachtet (Abb. 3.3 A, rechts). Je höher die verwendete TEA-Konzentration gewählt wurde, desto langsamer wurde der Block durch Arachidonsäure (Abb. 3.3 B). Die veränderte Kinetik der Arachidonsäure-Blockade lässt auf eine Konkurrenz mit TEA um die Bindungsstelle in der Kanalpore schließen (Abb. 3.3 C).

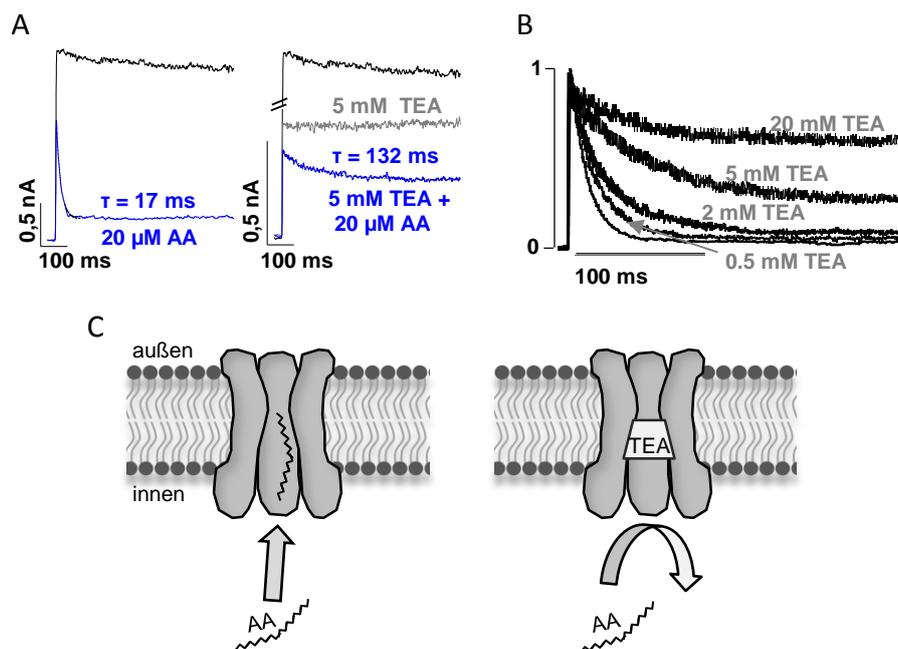


Abb. 3.3: **Arachidonsäure konkurriert mit TEA um die Bindung in der Pore.** **A)** Die Kinetik der Blockade des Kv1.1-Kanals durch Arachidonsäure kann durch eine Exponentialfunktion beschrieben werden und besitzt eine Zeitkonstante von  $\tau = 17$  ms (links). Werden die Kanäle zuvor durch TEA blockiert, so verlangsamt sich die Kinetik des zusätzlichen Blocks durch Arachidonsäure ( $\tau = 132$  ms) (rechts). **B)** Das Ausmaß der Verlangsamung der Arachidonsäureblockade ist von der TEA-Konzentration abhängig. **C)** Schemazeichnung zur Konkurrenz von TEA und Arachidonsäure in der Pore von Kv1.1-Kanälen. Die Bindungsstellen für Arachidonsäure (links) und TEA (rechts) überlappen, weshalb Arachidonsäure in Anwesenheit von TEA nicht, oder nur eingeschränkt, in der Pore binden kann.

### 3.1.2.4 Die Blockade der Kanalpore durch extrazellulär bindende Toxine wird durch die I400V Editierung nicht beeinflusst

Die Sensitivität von Kv1.1-Kanälen gegenüber HUFAs und den Blockersubstanzen Psora-4 und 4-AP wird durch die I400V Editierung herabgesetzt. Für 4-AP ist seit langem bekannt, dass es Kv-Kanäle von innen in der Pore blockieren kann (Choquet & Korn, 1992). Für die HUFA Arachidonsäure kann aufgrund der vorhergehenden Experimente ebenfalls auf einen Block der inneren Kanalpore geschlossen werden. Psora-4 wurde bisher als Blocker beschrieben, der die Öffnung der Kanäle benötigt, aber den inaktivierten Kanal bindet (Wulff & Zhorov, 2008). All diesen Kv-Kanalblockern ist gemeinsam, dass die Öffnung des Kanals der Blockade vorausgehen muss.

Skorpiontoxine blockieren Kv-Kanäle durch Bindung an den extrazellulären Porenbereich (Aiyar *et al*, 1995). Am Beispiel von rHongotoxin-1, einem Skorpiontoxin, wurde in darauffolgenden Experimenten untersucht, ob die I400V Editierung einen Einfluss auf extrazellulär angreifende Toxine ausübt. In TEVC-Versuchen mit editierten und nicht

editierten Kv1.1-Kanälen wurde rHongotoxin-1 in verschiedenen Konzentrationen appliziert. Kv1.1- und I400V-Kanäle zeigten nahezu identische Dosis-Wirkungsbeziehungen für rHongotoxin-1 (Abb. 3.4). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Editierung den Block durch rHongotoxin-1 nicht beeinflusst. Es scheint, dass nur die Blockade durch solche Substanzen, für die die Editierungsstelle Teil ihrer Bindungsstelle im Kanal ist (HUFAs, 4-AP und Psora-4), durch die Editierungsstelle beeinflusst wird.

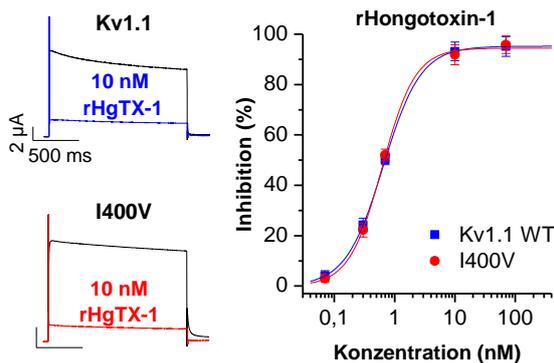


Abb. 3.4: **Die Kanalblockade durch rHongotoxin wird durch die Kv1.1 Editierung nicht beeinflusst.** Sowohl der Kv1.1-Kanal als auch der I400V-Kanal werden durch 10 nM rHongotoxin (rHgTX-1) zu über 85 % blockiert (repräsentative Messungen links). Die Editierung des Kv1.1-Kanals nimmt keinen Einfluss auf die Dosis-Wirkungsbeziehung für rHgTX-1 (rechts).

### 3.1.2.5 Molecular Modelling Experimente bestätigen die Bindung von Lipiden in der Kv1-Kanalpore

Die anhand von elektrophysiologischen Experimenten aufgestellte Hypothese einer Bindung von HUFAs und anderen Lipiden in der offenen Kanalpore wurde zusätzlich in Molecular Docking Experimenten auf Plausibilität überprüft. Dazu wurde ein zuvor auf Basis der Kristallstruktur des Kv1.2-Kanals erstelltes Poren-Homologiemodell (Decher *et al*, 2008; Long *et al*, 2005) genutzt und mittels der Software GOLD *in silico* die Bindung von Anandamid in der Kanalpore untersucht. Diese Molecular Docking Experimente wurden in Kollaboration mit der AG Klebe (Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Marburg) durchgeführt. Das Programm fand mehrere mögliche Konformationen, in denen Anandamid innerhalb der zentralen Kanalpore binden kann. Zur Veranschaulichung ist der Kanal in Abb. 3.5 A-C von der intrazellulären Seite aus als Kalottenmodell gezeigt. Die engste Stelle der unteren Pore, das PVP-Motiv, ist gelb markiert. Die meisten Simulationsergebnisse zeigten eine Orientierung von AEA (Abb. 3.5 B, in weiß), bei der der lipophile C20-Alkylrest in der Pore liegt und das Ethanolamid im Bereich der Threoninreste der Signatursequenz (Abb. 3.5 A, in rot) unterhalb des Selektivitätsfilters lokalisiert ist. Durch die Bindung des Anandamid in der Kanalpore ist deren Durchmesser eingeschränkt. Kaliumionen liegen im Zytosol sowie

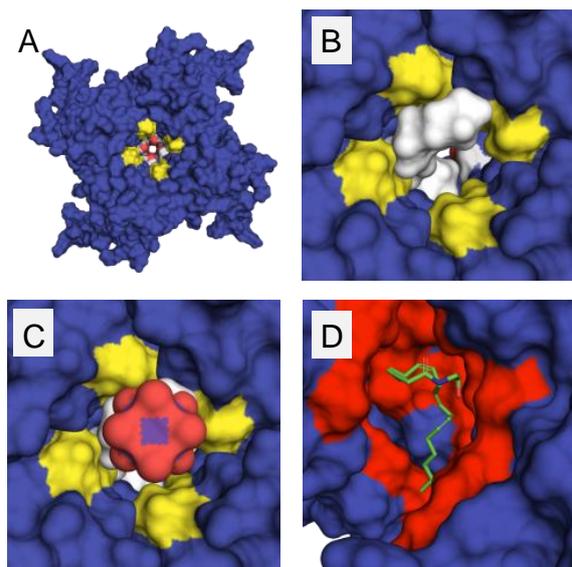


Abb. 3.5: **Molecular Docking Experimente bestätigen die Blockade der zentralen Kanalpore durch Lipide.** **A)** Das Modell zeigt den Kv1.1-Kanal von der intrazellulären Seite mit Blick durch die zentrale Kanalpore. Die PVP-Motive sind gelb gekennzeichnet. Die Threoninreste (T480) der Signatursequenz sind rot markiert. **B)** Vergrößerte Ansicht der zentralen Kanalpore aus A mit dem darin gebundenen Anandamid (weiß). **C)** Ein hydratisiertes Kaliumion ( $K^+$  in violett,  $H_2O$ -Moleküle in rot) ist zu groß, um die von Anandamid besetzte Pore zu passieren. **D)** Gezeigt ist ein Modell des Kv1.1-Kanals bestehend aus drei Kanaluntereinheiten, welches die Ansicht der Kanalpore von der Seite ermöglicht. In rot ist die Bindungsstelle für Lipide markiert, welche anhand eines Mutagenese-Scans ermittelt wurde. Das Anandamid-Molekül (Strichmodell) ist in einer der vorhergesagten Bindungskonformationen gezeigt.

extrazellulär in hydratisierter Form ( $K(H_2O)_8^+$ ) vor. Nur beim Passieren des Selektivitätsfilters streifen sie kurzfristig ihre Hydrathülle ab. Der Simulation nach kann ein hydratisiertes Kaliumion in Anwesenheit des Blockers den Selektivitätsfilter nicht mehr erreichen und somit den Kanal nicht passieren (Abb. 3.5 C). In meiner Diplomarbeit wurde das gesamte S6-Segment auf Interaktion mit Arachidonsäure untersucht und so die putative Bindungsstelle der Lipide identifiziert (siehe 1.3.4) (Streit, 2008). In Abb. 3.5 D ist in der Seitenansicht der Pore diese Bindungsstelle rot markiert und zusätzlich im Strichmodell eine von der Software ermittelte mögliche Konformation des Anandamid dargestellt. Die markierte Bindungsstelle deckt sich größtenteils mit den Kontaktpunkten des Anandamid-Moleküls mit der Porenwand. Unseren Molecular Docking Experimenten zu Folge gibt es weitere mögliche Bindungsmodi, bei denen der C20-Alkylrest des Lipids mit den zuvor elektrophysiologisch bestimmten Aminosäurepositionen innerhalb der Pore interagiert (nicht gezeigt). Dies verdeutlicht, dass die elektrophysiologisch ermittelte Bindungsstelle mit den Ergebnissen der Computersimulation vereinbar ist.

### 3.1.2.6 Beeinflussung der gesamten Kv1-Kanalfamilie durch editierte Kv1.1-Untereinheiten

In meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass editierte Kv1.1-Kanaluntereinheiten mit anderen  $\alpha$ -Untereinheiten innerhalb der Kv1-Kanalfamilie heteromerisieren (Streit, 2008). Im Rahmen meiner Doktorarbeit habe ich durch Ko-Expression editierter Kv1.1-Untereinheiten mit anderen Kv1-Kanaluntereinheiten (Kv1.1-Kv1.6) den Effekt der I400V Editierung auf die Pharmakologie heteromerer Kv1-Kanäle genauer untersucht. Diese Ko-Expression erfolgte

durch Ko-Injektion gleicher Mengen an cRNA der verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten. In TEVC-Messungen wurden 500 nM (bzw. 2  $\mu$ M für Kv1.4) des Blockers Psora-4 appliziert. Nicht editierte Kv1.1-Kanäle wurden zu  $\sim 80\%$  inhibiert, während Heteromere aus Kv1.1- und I400V-Untereinheiten nur zu  $\sim 20\%$  inhibiert wurden. Mit Ausnahme des Kv1.4-Kanals wurden alle weiteren homomeren Kv1-Kanäle (Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5 und Kv1.6) ebenfalls zu  $\sim 80\%$  blockiert; ebenso die Heteromere dieser Kanaluntereinheiten mit nicht editierten Kv1.1-Untereinheiten (Abb. 3.6 A und B). Alle Kv1-Subtypen zeigten als Heteromere mit den editierten Kv1.1-Untereinheiten hingegen eine signifikant verminderte Blockade durch Psora-4 (Abb. 3.6 A und B). Ein ähnliches Ergebnis zeigte ein vergleichbares Experiment, in dem der Block durch 10  $\mu$ M Arachidonsäure ebenfalls für heteromere und homomere Kanäle bestimmt wurde (Abb. 3.6 C). Die Kv1.1 Editierung moduliert daher auf zellulärer Ebene nicht

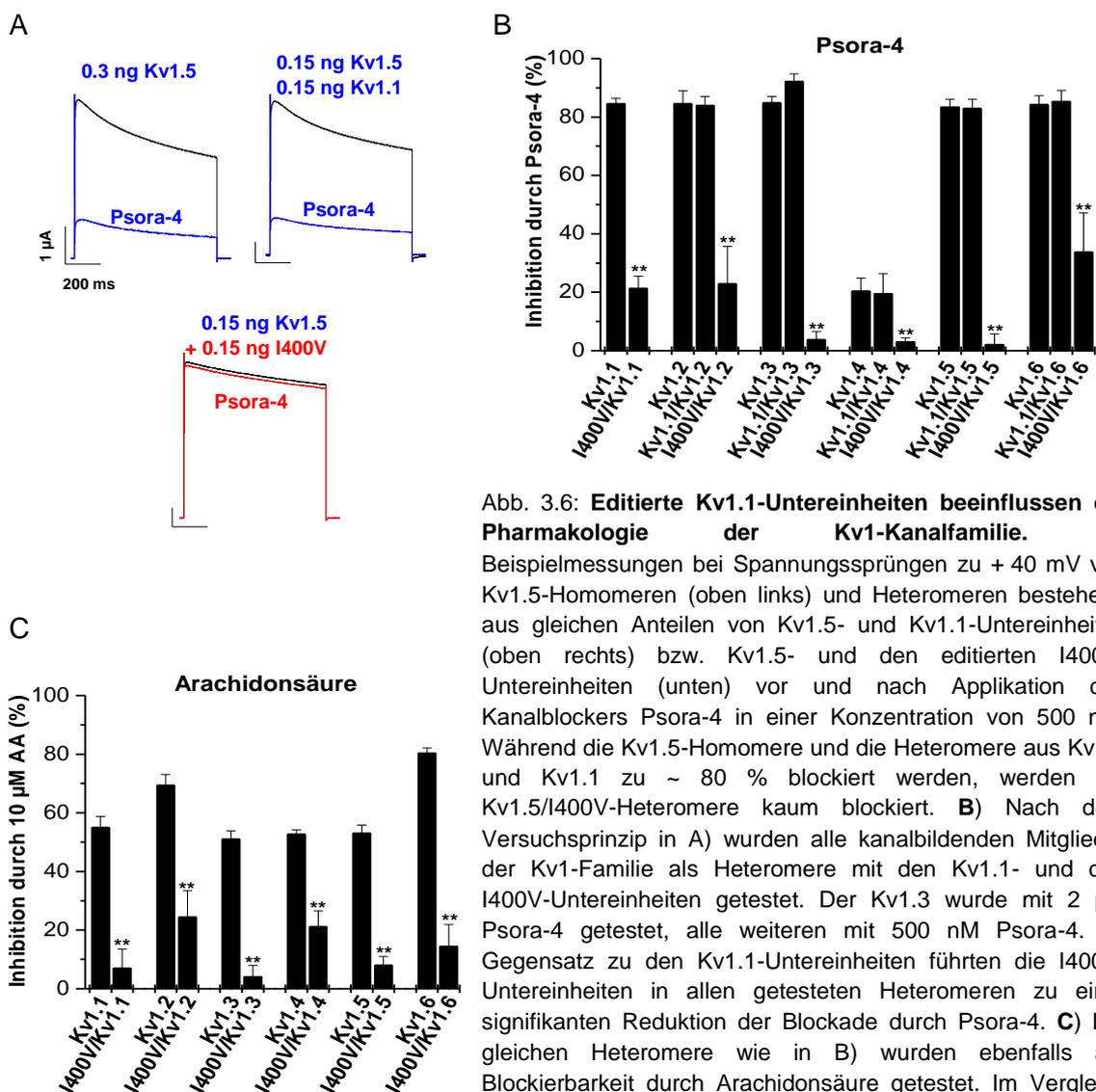


Abb. 3.6: **Editierte Kv1.1-Untereinheiten beeinflussen die Pharmakologie der Kv1-Kanalfamilie.** A)

Beispielmessungen bei Spannungssprüngen zu +40 mV von Kv1.5-Homomeren (oben links) und Heteromeren bestehend aus gleichen Anteilen von Kv1.5- und Kv1.1-Untereinheiten (oben rechts) bzw. Kv1.5- und den editierten I400V-Untereinheiten (unten) vor und nach Applikation des Kanalblockers Psora-4 in einer Konzentration von 500 nM. Während die Kv1.5-Homomere und die Heteromere aus Kv1.5 und Kv1.1 zu  $\sim 80\%$  blockiert werden, werden die Kv1.5/I400V-Heteromere kaum blockiert. B) Nach dem Versuchsprinzip in A) wurden alle kanalbildenden Mitglieder der Kv1-Familie als Heteromere mit den Kv1.1- und den I400V-Untereinheiten getestet. Der Kv1.3 wurde mit 2  $\mu$ M Psora-4 getestet, alle weiteren mit 500 nM Psora-4. Im Gegensatz zu den Kv1.1-Untereinheiten führten die I400V-Untereinheiten in allen getesteten Heteromeren zu einer signifikanten Reduktion der Blockade durch Psora-4. C) Die gleichen Heteromere wie in B) wurden ebenfalls auf Blockierbarkeit durch Arachidonsäure getestet. Im Vergleich zu den homomeren Kv1-Kanälen ist auch hier eine signifikant geringere Blockade zu verzeichnen.

nur die Pharmakologie und Lipid-Sensitivität von Kv1.1-Kanälen, sondern durch die Heteromerbildung potenziell auch die aller weiteren Kanäle der Kv1-Familie.

### 3.2 Untersuchungen zur pathophysiologischen Relevanz der Kv1.1 Editierung

Der Kv-Kanalblocker 4-AP löst bei Applikation in hippocampalen Hirnschnitten synchronisierte epileptiforme Potentiale aus, die auch als krampfähnliche Ereignisse (engl.: „seizure like events“; SLEs) bezeichnet werden. Durch Feldpotentialmessungen in kombinierten Hirnschnitten des Hippocampus und des entorhinalen Cortex (durchgeführt von unserem Kollaborationspartner Dr. Robert Zahn in der AG Heinemann, Institut für integrative Neuroanatomie, Charité Berlin) konnte gezeigt werden, dass diese iktogene Wirkung des Kv-Kanalblockers 4-AP in einem Kainat-induzierten Tiermodell für Temporallappenepilepsie (TLE) nicht vorhanden ist (Abb. 3.7 A). Da keine signifikanten Veränderungen im Expressionslevel der 4-AP-sensitiven Kv-Kanäle in chronisch epileptischen Tieren dieses Modells gefunden wurden, blieb die Frage nach dem Grund für das reduzierte iktogene Potential bisher ungeklärt (Zahn *et al*, 2008).

Im Rahmen meiner Diplomarbeit habe ich bereits begonnen das Ausmaß der Kv1.1 Editierung in Proben des entorhinalen Cortex zu untersuchen (Streit, 2008). Dem entorhinalen Cortex kommt bei der TLE eine besondere Bedeutung zu, da er häufig die epileptogene Zone, d.h. den Ausgangspunkt des Anfalls, beinhaltet (Spencer & Spencer,

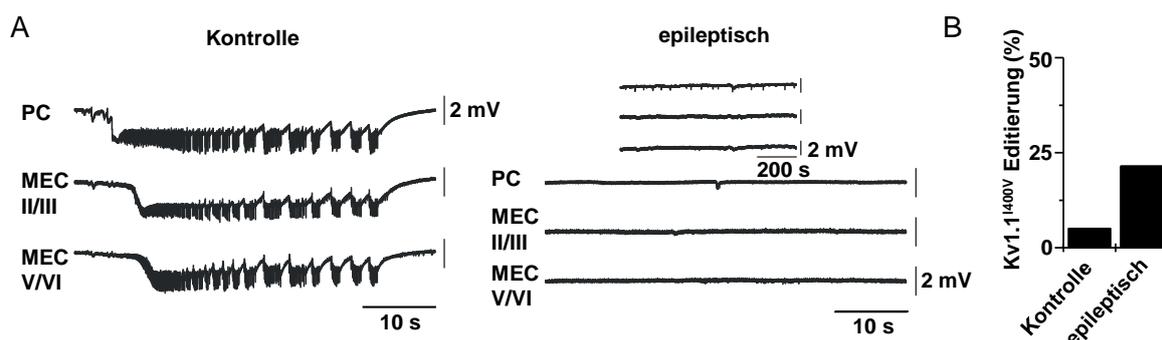


Abb. 3.7: **Reduziertes iktogenes Potential von 4-AP und erhöhte Kv1.1-Editierungslevel bei chronisch epileptischen Ratten des Kainat-induzierten Modells.** **A)** In extrazellulären Feldpotentialmessungen weisen Hirnschnitte gesunder Kontrolltiere in Anwesenheit von 100  $\mu$ M 4-AP anfallstypische Entladungsmuster im perirhinalen Cortex (PC) sowie in verschiedenen Schichten des medialen entorhinalen Cortex (MEC) auf (links). In Hirnschnitten chronisch epileptischer Tiere zeigt die gleiche Konzentration 4-AP auch über längere Zeiträume keine iktogene Wirkung (rechts). **B)** Eine quantitative Analyse der Kv1.1-1400V Editierung auf mRNA-Ebene im entorhinalen Cortex zeigte eine erhöhte Editierungsrate in epileptischen Tieren.

1994). Im Rahmen meiner Doktorarbeit konnte ich eine vollständige Quantifizierung der Editierung im entorhinalen Cortex vornehmen und habe eine erhöhte Editierungsrate in den Proben chronisch epileptischer Ratten gefunden (Abb. 3.7 B). Die Folgen der erhöhten Editierung auf die 4-AP Sensitivität wurden anhand der folgenden Experimente genauer untersucht.

### 3.2.1 Die vermehrte Kv1.1-Editierung im entorhinalen Cortex epileptischer Ratten bewirkt eine verminderte 4-AP Sensitivität heteromerer Kv1-Kanäle

Wie bereits erläutert, bilden editierte Kv1.1-Untereinheiten heteromere Kanäle mit nicht-editierten Untereinheiten. Um das Verhältnis von editierten zu nicht-editierten Kv1.1-Kanaluntereinheiten des entorhinalen Cortex epileptischer Tiere im Expressionssystem *Xenopus* Oozyten zu reproduzieren, wurde ein cRNA-Gemisch bestehend aus 75 % Kv1.1-cRNA und 25 % I400V-cRNA injiziert. In TEVC-Messungen wurde das Ausmaß der Inhibition dieser heteromeren Kanäle durch 100  $\mu$ M 4-AP getestet. Diese 4-AP Konzentration wurde gewählt, da sie zuvor zur Prüfung des ictogenen Potentials in Hirnschnitten der Tiere verwendet wurde (Streit *et al*, 2011). Während Kanalhomomere aus nicht-editierten Untereinheiten durch 100  $\mu$ M 4-AP zu  $44 \pm 4$  % inhibiert wurden, wurden die heteromeren Kanäle lediglich zu  $21 \pm 4$  % blockiert (Abb. 3.8 A). Diese reduzierte Affinität der Kv1-Kanäle durch das Vorhandensein editierter Untereinheiten könnte die molekulare Grundlage für das reduzierte ictogene Potential von 4-AP in den Hirnschnitten der chronisch epileptischen Tiere

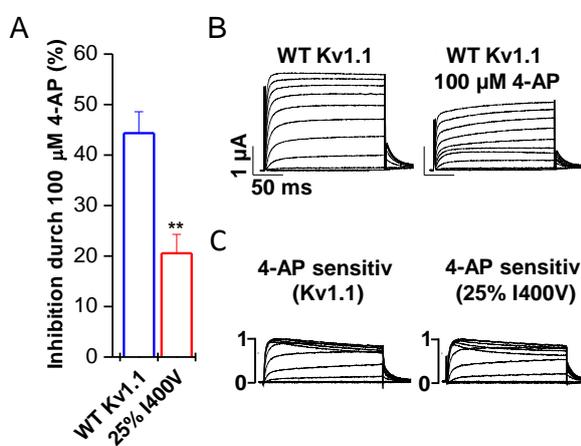


Abb. 3.8 **Erhöhte Kv1.1 Editierungslevel reduzieren die 4-AP Affinität.** **A**) Durch Ko-Injektion von 25 % I400V- und 75 % Kv1.1-cRNA in *Xenopus* Oozyten wurde die erhöhte Editierungsrate der epileptischen Tiere reproduziert. Die entstehenden Kanäle zeigten, ausgewertet bei +40 mV, unter Applikation von 100  $\mu$ M 4-AP eine Blockade von  $21 \pm 4$  % ( $n = 9$ ) (rot), während nicht editierte Kv1.1-Homomere zu  $44 \pm 4$  % ( $n = 8$ ) blockiert wurden (blau). **B**) Beispielmessung der Kv1.1-Homomere vor (links) und nach (rechts) Applikation von 100  $\mu$ M 4-AP bei verschiedenen Potentialen (Spannungsprotokoll siehe Abb. 3.9 A). **C**) Der Differenzstrom (vor und nach Applikation von 4-AP) spiegelt den 4-AP sensitiven Stromanteil wider. Die Form des 4-AP sensitiven Stromanteils wird durch die Anwesenheit der I400V-Untereinheiten nicht beeinflusst.

darstellen. In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob die I400V Editierung im entorhinalen Cortex auch die Kinetik und/oder die Spannungsabhängigkeit des 4-AP Blocks modulieren könnte.

### 3.2.2 Untersuchung der Spannungsabhängigkeit und Kinetik des 4-AP Blocks

Von homomeren, nicht editierten Kanälen (WT Kv1.1) und den oben beschriebenen heteromeren Kanälen (25 % I400V) wurde vor und nach Applikation von 100  $\mu\text{M}$  4-AP ein Strom-Spannungsprotokoll aufgenommen (Abb. 3.9 A, Schemazeichnung). Das Ausmaß des prozentualen Blocks wird geringer, je positiver das Testpotential ist. Diese Spannungsabhängigkeit des Blocks ist charakteristisch für die Inhibition von Kv-Kanälen durch 4-AP. Sie kann darauf zurückgeführt werden, dass 4-AP ebenfalls eine Affinität für den geschlossenen Kanal besitzt und diesen blockiert (siehe 1.2.3.4). Bei Öffnung der Kanäle entfällt diese Komponente des Blocks (Remillard & Leblanc, 1996).

Die heteromeren Kanäle werden insgesamt in geringerem Maße blockiert, weisen jedoch ebenfalls eine Spannungsabhängigkeit der Blockade auf (Abb. 3.9 A). Aus dem gleichen Spannungsprotokoll wurden ebenfalls die Aktivierungskurven vor und nach 4-AP Applikation ermittelt. Dazu wurde die Stromamplitude zu Anfang des Nachpulses bei -40 mV abgelesen, auf den höchsten Wert normiert und gegen die Spannung des vorhergehenden Testpulses aufgetragen (Abb. 3.9 B und C). Wie in der Literatur beschrieben, kann die Aktivierungskurve der homomeren Kanäle vor der 4-AP Applikation durch eine einfache Boltzmann-Gleichung beschrieben werden (Abb. 3.9 B) (Labro *et al*, 2008; Sukhareva *et al*, 2003). Die Aktivierungskurve der Heteromere (25 % I400V) folgt ebenfalls einer einfachen Boltzmann-Gleichung und unterscheidet sich nicht signifikant von der Kurve für die homomeren Kanäle (Abb. 3.9 B). In Anwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  4-AP besteht ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der Aktivierungskurve der homomeren und heteromeren Kanäle, beide Kurven können durch eine doppelte Boltzmann-Funktion beschrieben werden (Abb. 3.9 C). Diese Kurvenform ist vermutlich auf die Spannungsabhängigkeit der Blockade durch 4-AP zurückzuführen. Als weiterer Parameter wurde der zeitliche Verlauf des einsetzenden Blocks nach Applikation von 4-AP untersucht. Der Zeitverlauf des Blocks konnte sowohl für die homomeren als auch die heteromeren Kanäle durch eine einfache Exponentialfunktion beschrieben werden (Abb. 3.9 D, rot dargestellte Kurven). Die Zeitkonstanten deuten nicht auf einen signifikanten Unterschied im Zeitverlauf des Blocks hin ( $\tau = 59,6$  ms (Kv1.1) vs.  $\tau = 58,6$  ms (25 % I400V)).

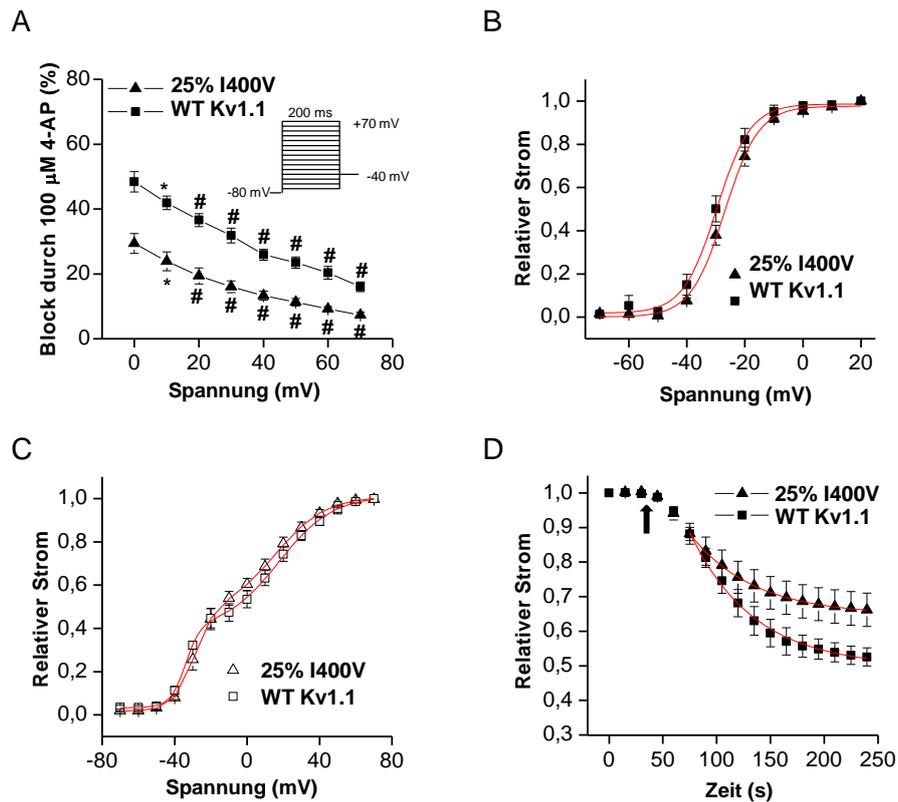


Abb. 3.9: **Spannungsabhängigkeit, Aktivierungskurven und Blockkinetik werden durch das erhöhte Editierungslevel nicht verändert.** **A)** Kv1.1-Homomere und -Heteromere mit 25 % editierten Untereinheiten wurden in *Xenopus* Oozyten auf eine Spannungsabhängigkeit des 4-AP Blocks getestet. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden depolarisierende Pulse zwischen -70 mV und +70 mV angelegt, gefolgt von einem Nachpuls zu -40 mV (siehe Schema). Sowohl die Homomere als auch die Heteromere zeigen eine signifikante Abnahme des Blocks bei steigendem Potential. **B)** Aus dem Nachpuls wurde die Aktivierungskurve (G/G<sub>max</sub>) vor der Applikation von 4-AP bestimmt. Diese kann durch eine Boltzmann-Gleichung beschrieben werden (rot) und unterscheidet sich zwischen den Homomeren und Heteromeren nicht. **C)** Die Aktivierungskurven in Anwesenheit von 100  $\mu$ M 4-AP folgen einer doppelten Boltzmann-Gleichung (rot). Zwischen den homomeren und den heteromeren Kanälen besteht auch in Anwesenheit von 4-AP kein Unterschied in der Aktivierungskurve. **D)** Der Zeitverlauf, mit dem der Block ab Beginn der 4-AP-Applikation (siehe Pfeil) einsetzt, kann durch eine Exponentialgleichung beschrieben werden (rot). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitkonstanten der homomeren und heteromeren Kanäle (59,6 ms vs. 58,6 ms). '#' zeigt einen P-Wert kleiner 0,005 an.

### 3.3 Untersuchungen zur veränderten Stromgröße editierter Kv1.1-Kanäle

Der Unterschied in der Größe der Ganzzellströme von Kv1.1- und I400V-Kanälen in *Xenopus* Oozyten stellt eine zuvor unbekannte Folge der Kv1.1 Editierung dar. In den folgenden Versuchen wurde dieses Phänomen mittels verschiedener Expressionssysteme und Techniken untersucht, mit dem Ziel die molekulare Grundlage für die verringerte Stromgröße aufzudecken.

### 3.3.1 Validierung des Stromgrößeneffektes in einer humanen Zelllinie

Zunächst wurde getestet, ob der Effekt der Editierung auf die Ganzzellstromgröße auch in transfizierten Säugerzellen zu beobachten ist. Dazu wurden die Kanalsequenzen des Kv1.1- und des I400V-Kanals in einen pEGFP-Vektor subkloniert. Dadurch werden die Kanäle als EGFP-Fusionsproteine exprimiert, d.h. sie tragen eine N-terminale Markierung mit dem grün fluoreszierenden Protein EGFP, was die Identifizierung transfizierter Zellen unter UV-Licht ermöglicht (siehe 2.3.5).

Der N-Terminus des Kv1.1-Kanals wurde aufgrund einer Studie über den Kv1.2-Kanal, in der die N-terminale Markierung bereits erfolgreich verwendet wurde (Gu *et al*, 2003), als Ort der EGFP-Markierung gewählt. Die Transfektion der Kv1.1-EGFP und I400V-EGFP Plasmide in HeLa-Zellen erfolgte zeitgleich und in gleichen Konzentrationen (1 µg Plasmid-DNA pro 35 mm Kulturschale), was einen direkten Vergleich ermöglichte. 24 bis 30 h nach der Transfektion wurden Patch-Clamp Messungen durchgeführt. Als erstes wurde die Stromdichte (J) ermittelt. Diese errechnet sich aus dem Quotienten der gemessenen Stromgröße (I) und der ermittelten Zellkapazität (C). Die Zellkapazität hängt von der Fläche der Zellmembran ab und spiegelt somit die Größe der Zelle wider. Da auch nicht transfizierte HeLa-Zellen bei Depolarisation kleine Auswärtsströme aufweisen, wurden als Kontrollen HeLa-Zellen gemessen, die mit dem pEGFP Vektor (exprimiert nur pEGFP, ohne Kanal) transfiziert waren. Die Stromdichte der Kontrollzellen bei +50 mV betrug im Mittel  $13,1 \pm 3,6$  pA/pF (n = 5). Dieser Wert wurde von den Rohdaten für die Stromdichte transfizierter Zellen abgezogen. Die Zellen, welche nicht editierte Kv1.1-Kanäle exprimierten, zeigten bei +50 mV eine mittlere Stromdichte von  $54 \pm 7$  pA/pF (n = 17). Die Zellen, welche die editierte Kanalform (I400V) exprimierten, wiesen hingegen im Mittel eine Stromdichte von  $25 \pm 6$  pA/pF (n = 13) auf (Abb. 3.10 A). Im Verhältnis erreichen die Zellen die editierte Kanäle exprimieren somit nur ~ 46 % der Stromdichte, die von Zellen mit nicht editierten Kv1.1-Kanälen erreicht wird. Dieses Ergebnis spiegelt den zuvor in Oozyten beobachteten Effekt der Kv1.1 Editierung auf die Stromgröße wider (siehe 1.3.4). Da der Effekt somit auch in humanen Zellen validiert werden konnte, wurde in den darauffolgenden Experimenten nach dem molekularen Korrelat zu dieser Stromreduktion gesucht.

### 3.3.2 Vergleich der Spannungsabhängigkeit von Kv1.1- und I400V-Kanälen

Ebenfalls mittels Patch-Clamp Messungen in der Ganzzellkonfiguration wurde die Stromantwort der Kv1.1- und der editierten I400V-Kanäle bei verschiedenen Membranpotentialen analysiert (Abb. 3.10 B). Die Zellen wurden dazu ausgehend von -80 mV für 500 ms auf Potentiale zwischen -70 und +50 mV depolarisiert, anschließend folgte ein Nachpuls zu -40 mV. Beispielmessungen für Kv1.1 und I400V sowie das Spannungsprotokoll sind in Abb. 3.10 B gezeigt. Zur Erstellung der Strom-Spannungskurven (I/V) wurden die Stromgrößen am Ende des 500 ms Testpulses abgelesen (Abb. 3.10 B, durchgezogener Pfeil) und auf die Stromgröße bei +50 mV normalisiert. Die gemittelten Strom-Spannungskurven des nicht editierten und des editierten Kanals sind nahezu identisch (Abb. 3.10 C). Zur Bestimmung der Leitfähigkeit-Spannungskurve (G/V), auch Aktivierungskurve genannt, wurde das gleiche Spannungsprotokoll verwendet und diesmal die Stromamplitude des transienten Stromes während des Nachpulses bei -40 mV bestimmt (Abb. 3.10 B, gestrichelter Pfeil). Auch in der Leitfähigkeit-Spannungsbeziehung wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Kv1.1- und I400V-Kanälen beobachtet (Abb. 3.10 D).

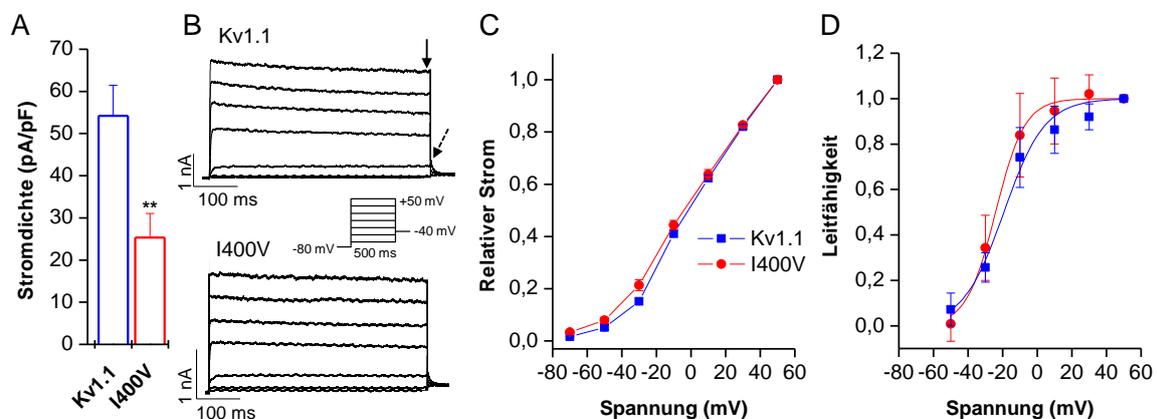


Abb. 3.10: **Vergleich der Ganzzellströme nicht editierter und editierter EGFP-markierter Kv1.1-Kanäle in HeLa-Zellen.** **A)** Bei gleichen Expressionsbedingungen weisen Kv1.1-transfizierte Zellen bei +50 mV eine Stromdichte von  $54 \pm 7$  pA/pF auf ( $n = 17$ ), während I400V-transfizierte Zellen im Mittel eine Stromdichte von  $25 \pm 6$  pA/pF erreichen ( $n = 13$ ). **B)** Beispielmessungen der Ganzzellströme von Kv1.1 und I400V. Das verwendete Spannungsprotokoll besteht (ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV) aus depolarisierenden Sprüngen von -70 mV bis +50 mV und einem anschließenden Nachpuls zu -40 mV (siehe Schema). Die Strom-Spannungskurven (C) ergeben sich durch Auftragen der Ströme am Ende der depolarisierenden Pulse (durchgezogener Pfeil) gegen die angelegte Spannung, die Aktivierungskurven (D) durch Auftragen der Tail-Ströme zu Anfang der Nachpulse (unterbrochener Pfeil). **C)** Die Strom-Spannungsbeziehungen des Kv1.1- und des I400V-Kanals unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (pro Messpunkt  $n = 17$  bzw.  $n = 13$ ). **D)** Die Aktivierungskurven zeigen keine signifikanten Unterschiede, das Potential der halbmaximalen Aktivierung ( $V_{1/2}$ ) beträgt  $-19,3 \pm 2$  mV für den Kv1.1- und  $-24,1 \pm 0,9$  mV für den I400V-Kanal (pro Messpunkt  $n = 7$  bzw.  $n = 4$ ).

Zusammenfassend unterscheiden sich der Kv1.1- und der I400V-Kanal auf Ebene der Ganzzellmessungen nur in ihrer Stromdichte, jedoch weder in ihrem Strom-Spannungsverhältnis noch in ihrem Leitfähigkeits-Spannungsverhältnis.

### 3.3.3 Untersuchung der Einzelkanaleigenschaften von Kv1.1- und I400V-Kanälen

Erneut wurden die Kanäle in humanen Zellen, diesmal HEK293, exprimiert und das Öffnungs- und Schließverhalten einzelner Kanäle untersucht. Ausgehend von einem Haltepotential von -77 mV, bei dem Kv-Kanäle geschlossen vorliegen, wurde der Membranfleck auf +53 mV depolarisiert. Kv1.1- bzw. I400V-Kanäle, die sich in der Membran unterhalb der Pipettenöffnung befanden, wurden somit aktiviert. Die Öffnung der Kanäle spiegelte sich in einem Auswärtsstrom wider (Abb. 3.11 A). Öffnungen traten in sogenannten „Bursts“ auf (engl.: „burst“ = Häufung, Ausbruch). Als Burst bezeichnet man lange Offenphasen des Kanals, die durch kurze Schließungen unterbrochen werden. Um eine einheitliche Auswertung zu gewährleisten, wurden Offenzeiten, die durch Schließungen von > 10 ms getrennt wurden, als einzelne Bursts betrachtet. Als erstes wurde anhand von Amplitudenhistogrammen ermittelt, welchen Zeitanteil innerhalb eines Bursts der Kanal in der offenen ( $f_{ob}$ ) bzw. der geschlossenen ( $f_{cb}$ ) Konformation verbringt. Für den nicht editierten Kanal ergab sich ein  $f_{ob}$ -Wert von  $0,950 \pm 0,002$  ( $n = 25$  aus 5 verschiedenen Patches) innerhalb der Burstzeit und folglich ein  $f_{cb}$ -Wert von  $0,050 \pm 0,002$ . Die gleiche Analyse für den editierten Kanal ergab einen  $f_{ob}$ -Wert von  $0,945 \pm 0,06$  ( $n = 12$  aus 7 verschiedenen Patches) und einen  $f_{cb}$ -Wert von  $0,055 \pm 0,06$ .

Daraufhin wurde die durchschnittliche Dauer eines Bursts ermittelt. Dazu wurde der Membranfleck ausgehend von -77 mV für 1 s auf +53 mV depolarisiert. Die letzten 700 ms der Depolarisationsphase wurden zur Auswertung der Burst-Dauer genutzt. Folgende Formel wurde zur Berechnung der Burst-Dauer ( $\tau_b$ ) verwendet:

$$\tau_b = \sum_j j \frac{f_j}{n_t} * \left( 1 + \frac{f_{cb}}{f_{ob}} \right)$$

In dieser Formel beschreibt  $j$  die Anzahl der offenen Kanäle; solange sich nur ein Kanal im gemessenen Membranfleck befindet, bleibt dieser Term stets 1. Wird die Aktivität mehr als eines Kanals detektiert, so erhöht sich der Term entsprechend der Anzahl der Kanäle. Der Term  $f_j$  beschreibt den Zeitanteil, den der Kanal (bzw. die Kanäle) im offenen Zustand verbringt, während  $n_t$  die Anzahl der Übergänge vom offenen in den geschlossenen Zustand

(Schließungen > 10 ms) pro Sekunde anzeigt. Der Korrekturfaktor  $(1 + f_{cb}/f_{ob})$  wurde in die Berechnung integriert, um die kurzen Schließungen während eines Bursts auszugleichen. Vereinfacht betrachtet, wurde die Offenzeit eines Kanals durch die Anzahl seiner Schließungen > 10 ms geteilt und somit die mittlere Dauer eines Bursts berechnet.

Laut dieser Berechnung betrug die mittlere Burst-Dauer  $298 \pm 54$  ms ( $n = 13$ ) für den Kv1.1-Kanal und  $375 \pm 92$  ms ( $n = 6$ ) für den I400V-Kanal (Abb. 3.11 B). Weder die zuvor bestimmten Offenzeiten während eines Bursts ( $f_{ob}$ ), noch die mittlere Burst-Dauer der I400V-Kanäle ( $\tau_b$ ) unterscheiden sich signifikant von den Werten, die für den Kv1.1-Kanal erhoben wurden.

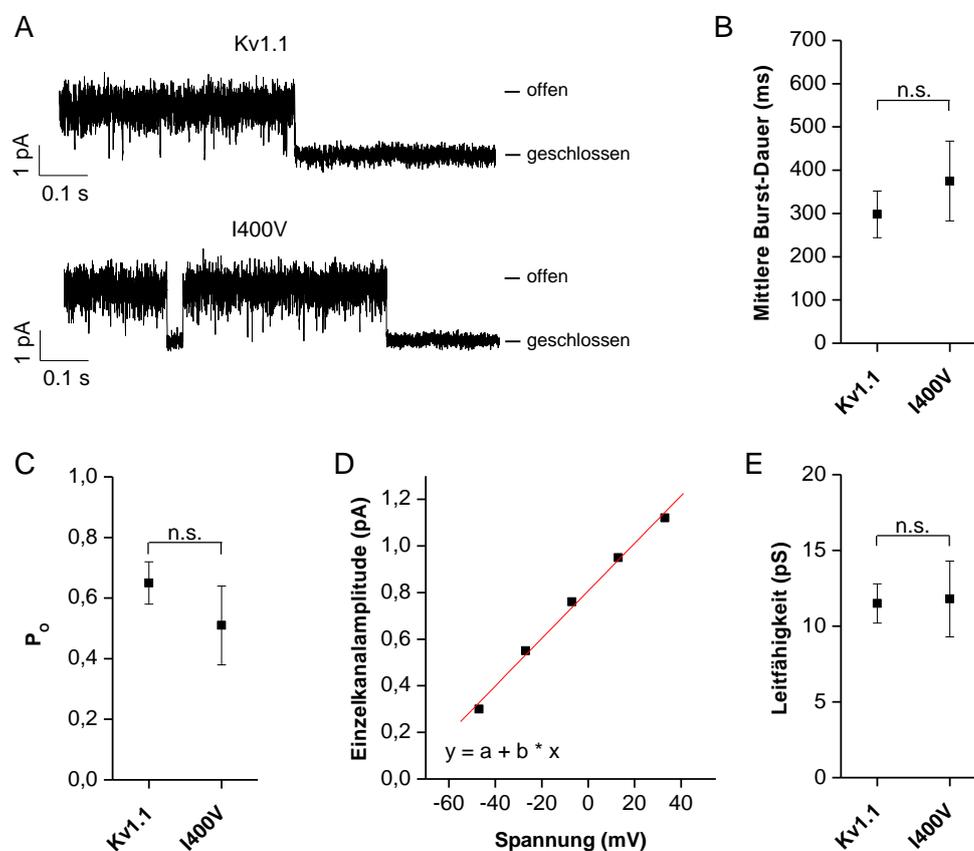


Abb. 3.11: **Einzelkanalanalyse nicht editierter und editierter Kv1.1-Kanäle in HEK293-Zellen.** **A)** Beispielmessungen von einzelnen Kv1.1- bzw. I400V-Kanälen in der On-cell Konfiguration bei einer Depolarisation des Membranflecks auf +53 mV. Beide Kanäle zeigen ein Burst-Verhalten. **B)** Die mittlere Dauer eines Bursts beträgt  $298 \pm 54$  ms für Kv1.1-Kanäle und  $375 \pm 92$  ms für I400V-Kanäle. **C)** Die Offenwahrscheinlichkeit ( $P_o$ ) der Kanäle beträgt  $0,65 \pm 0,07$  (Kv1.1) und  $0,51 \pm 0,13$  (I400V). **D)** Beispiel einer Leitfähigkeitsbestimmung anhand einer Einzelkanalmessung eines I400V-Kanals. Die Stromamplitude ist gegen die anliegende transmembranäre Spannung aufgetragen. Die Steigung ( $b$ ) der Ausgleichsgeraden (rot) gibt die Leitfähigkeit wieder. Die Leitfähigkeit des I400V-Kanals dieser Beispielmessung beträgt 8,1 pS. **E)** Die Mittelwerte der Leitfähigkeiten des Kv1.1- und des I400V-Kanals betragen  $11,5 \pm 1,3$  pS bzw.  $11,8 \pm 2,5$  pS. **n.s.:** nicht signifikant.

Die Offenwahrscheinlichkeit der Kv1.1- und I400V-Kanäle wurde aus den gleichen Messungen, wie die Burst-Dauer bestimmt. Sie betrug  $0,65 \pm 0,07$  ( $n = 14$ ) für Kv1.1- und  $0,51 \pm 0,13$  ( $n = 6$ ) für I400V-Kanäle (Abb. 3.11 C). Als weiterer Parameter der Einzelkanalanalyse wurde die Leitfähigkeit der Einzelkanäle bestimmt. Zu diesem Zweck wurde der Membranfleck ausgehend von  $-77$  mV auf verschiedene depolarisierende Potentiale gebracht und jeweils die Stromgröße (in pA) während der Einzelkanal-Bursts bestimmt. Die Stromgröße von mindestens drei Potentialen (im Bereich von  $-50$  bis  $+70$  mV) wurde gegen das jeweilige Potential aufgetragen und zur Erstellung einer Ausgleichsgeraden genutzt.

Die Steigung der Ausgleichsgeraden spiegelt die Leitfähigkeit des Kanals wider (Beispiel siehe Abb. 3.11 D). Für den Kv1.1-Kanal ergab sich somit im Mittel eine Einzelkanalleitfähigkeit von  $11,5 \pm 1,3$  pS ( $n = 7$ ) und für den I400V-Kanal von  $11,8 \pm 2,5$  pS ( $n = 7$ ) (Abb. 3.11 E).

Zusammengefasst weist keiner der auf Einzelkanalebene untersuchten Parameter einen signifikanten Unterschied zwischen nicht editierten und editierten Kv1.1-Kanälen auf. Der molekulare Hintergrund des auf Ganzzelebene beobachteten Stromunterschieds scheint daher von den Einzelkanalcharakteristika unabhängig zu sein.

### 3.3.4 Untersuchung der Oberflächenexpression von Kv1.1- und I400V-Kanälen

Eine weitere mögliche Ursache für eine Reduktion des Ganzzellstromes kann eine reduzierte Anzahl von Kanälen an der Zellmembran sein.

#### 3.3.4.1 Erstellung und Überprüfung der extrazellulär HA-markierten Kanal-Konstrukte

Um eine Analyse der Oberflächenexpression von Kv1.1- und I400V-Kanälen durchführen zu können, wurden zunächst Kanalkonstrukte kloniert, die im extrazellulären Bereich zwischen dem S1- und S2-Segment ein Hämagglutinin-Epitop (HA-Epitop) aufweisen (Abb. 3.12 A). Dieser Bereich wurde bereits erfolgreich zur HA-Markierung des Kv1.2-Kanals genutzt (Gu *et al*, 2003). Bei der Herstellung der Konstrukte wurde darauf geachtet, dass die Sequenz des HA-Epitops sowohl einige Aminosäurepositionen Abstand von dem für den Kanaltransport

bedeutenden Threoninrest (T) (Mckeown *et al*, 2008) als auch von der bekannten Glykosylierungsstelle (NTT) (Zhu *et al*, 2003) in diesem Sequenzabschnitt aufweist (Abb. 3.12 A; „T“ in blau, „NTT“ in grün).

Die cRNAs dieser Kv1.1-HA und I400V-HA Konstrukte wurden zeitgleich und in gleichen Mengen (je 5 ng cRNA pro Oozyte) in *Xenopus* Oozyten injiziert. Die Expression der HA-Kanalkonstrukte wurde zunächst ~ 48 h nach Injektion in TEVC-Messungen getestet. Der I400V-HA-Kanal erreichte dabei im Mittel  $36,8 \pm 3,7$  % der Stromgröße des Kv1.1-HA-Kanals ( $n = 29$ ) (Abb. 3.12 B). Diese Stromreduktion des I400V-Kanals stimmt mit den zuvor beobachteten Ergebnissen der Kanäle ohne HA-Markierung überein (Abb. 1.8 und 3.10 A). Dies zeigt, dass die HA-Markierung die Stromgröße nicht beeinflusst und die erstellten HA-Konstrukte daher zur Analyse der Oberflächenexpression verwendet werden konnten.

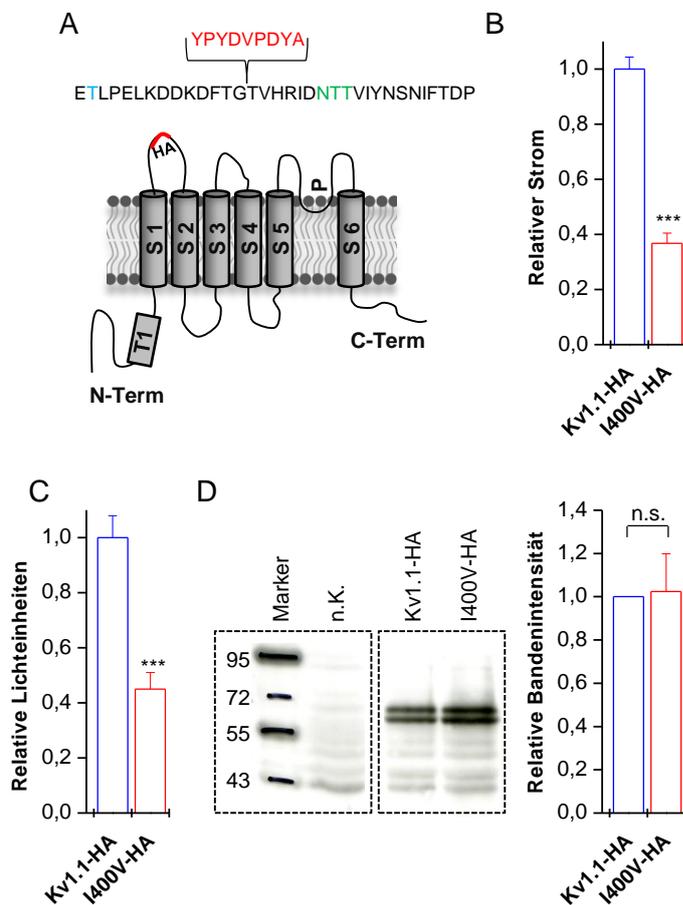


Abb. 3.12: **Expressionsanalyse der nicht editierten und editierten Kv1.1-Kanäle in *Xenopus* Oozyten.** **A)** Lokalisation des eingeführten Hämagglutinin-Epitops (HA, rot) in der extrazellulären Verbindung zwischen S1- und S2-Segment (Details siehe Text). **B)** Bestimmung der relativen Stromgröße von HA-markierten Kv1.1- und I400V-Kanälen bei +40 mV in TEVC-Messungen. Die I400V-Kanäle erreichen  $36,8 \pm 3,7$  % der Stromgröße der Kv1.1-Kanäle. **C)** Die Ergebnisse der Chemilumineszenzanalyse werden in relativen Lichteinheiten angegeben und spiegeln die Oberflächenexpression der Kanäle wider. Der editierte Kanal I400V weist  $45 \pm 6$  % der Oberflächenexpression des nicht editierten Kv1.1-Kanals auf. **D)** Quantifizierung der Proteinmenge von Kv1.1- und I400V-Kanälen mittels Western Blot Analysen von Gesamtproteinlysaten aus *Xenopus* Oozyten. Links: Repräsentativer Western Blot von Gesamtproteinlysaten (**n.K.**: negativ Kontrolle, nicht injizierte Oozyten). Rechts: Mittelwerte der relativen Bandenintensitäten für Kv1.1-HA und I400V-HA bestimmt aus vier Western Blots. **n.s.**: nicht signifikant.

### 3.3.4.2 Quantifizierung der Oberflächenexpression mittels Chemilumineszenzanalyse

In den darauffolgenden Versuchen wurde 48 h nach Injektion von je 5 ng Kv1.1-HA cRNA oder I400V-HA cRNA (pro Oozyte) mittels Chemilumineszenzanalyse die Oberflächenexpression der Kanäle bestimmt. Der I400V-HA-Kanal zeigte dabei im Mittel lediglich  $45 \pm 6$  % der vom Kv1.1-HA-Kanal erreichten relativen Lichteinheiten ( $n = 64$ ) (Abb. 3.12 C). Dies spiegelt eine reduzierte Oberflächenexpression des editierten Kanals wider. Stromgröße und Oberflächenexpression des I400V-Kanals sind, jeweils in Relation zum Kv1.1-Kanal, zu ähnlichen prozentualen Anteilen reduziert (Abb. 3.12 B und C).

### 3.3.4.3 Quantifizierung des Gesamtproteins

Eine reduzierte Oberflächenexpression, wie sie im vorhergehenden Abschnitt für den I400V-Kanal beschrieben wurde, kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Zum einen kann ihr ein veränderter Transport der Kanäle innerhalb der Zelle zugrunde liegen: Sowohl ein verminderter anterograder Transport der Kanäle zur Zellmembran, als auch ein verstärkter retrograder Transport in Richtung des Zellinneren, könnte zu einer verringerten Anzahl an Kanälen in der Zellmembran führen. Zum anderen könnte auch eine verminderte Gesamtmenge des Kanalproteins in der Zelle vorliegen, was wiederum auf einer reduzierten Proteinsyntheserate oder einer Instabilität (bzw. einem vermehrtem Abbau) des Proteins beruhen kann. Zur Quantifizierung der Gesamtproteinmenge des Kv1.1- und I400V-Kanals wurden erneut je 5 ng der Kv1.1-HA cRNA oder I400V-HA cRNA pro *Xenopus* Oozyte injiziert. Nach 48 h wurde aus je 20 Oozyten pro Konstrukt eine Proteinextraktion durchgeführt. Die Proteinlysate wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Mittels Western Blot konnten die HA-markierten Kanalproteine anhand von HA-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 3.12 D, links). Sowohl das Kv1.1-HA- als auch das I400V-HA-Protein werden als Doppelbande bei  $\sim 60$  und  $65$  kDa detektiert. Für das Kv1.1-Protein ist bereits beschrieben, dass es aufgrund verschiedener Glykosylierungszustände als Doppelbande auftreten kann (Pineda *et al*, 2008). Die Software-gestützte Intensitätsanalyse (siehe 2.1.20) der Banden aus vier Injektionen ergab, dass sich die Bandenintensitäten des I400V-Proteins im Mittel nicht signifikant von denen des Kv1.1-Proteins unterscheiden (Abb. 3.12 D, rechts). Die Editierung des Kv1.1-Kanals scheint daher keinen Einfluss auf die Proteininstabilität oder -syntheserate zu nehmen.

### 3.3.4.4 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis des Transportdefizits der editierten Kv1.1-Kanäle in HeLa-Zellen

Obwohl die heterologe Expression von Kv1.1-Untereinheiten in Kulturzellen zur elektrophysiologisch nachweisbaren Oberflächenexpression funktioneller Kanäle führt, lassen sich homomere Kv1.1-Kanäle fluoreszenzmikroskopisch nur im Zellinneren und nicht an der Zellmembran nachweisen (Manganas & Trimmer, 2000). Daher ist es mit dieser Methode nicht ohne Weiteres möglich die Transportunterschiede zwischen Kv1.1- und I400V-Untereinheiten in homomeren Kanälen zu untersuchen. Die Untereinheiten des verwandten Kv1.4-Kanals lassen sich hingegen in hohem Maße in der Zellmembran nachweisen. Bei Ko-Expression von Kv1.1- und Kv1.4- Untereinheiten in Kulturzellen bilden sich heteromere Kanäle, die durch die Anwesenheit von Kv1.4-Untereinheiten zur

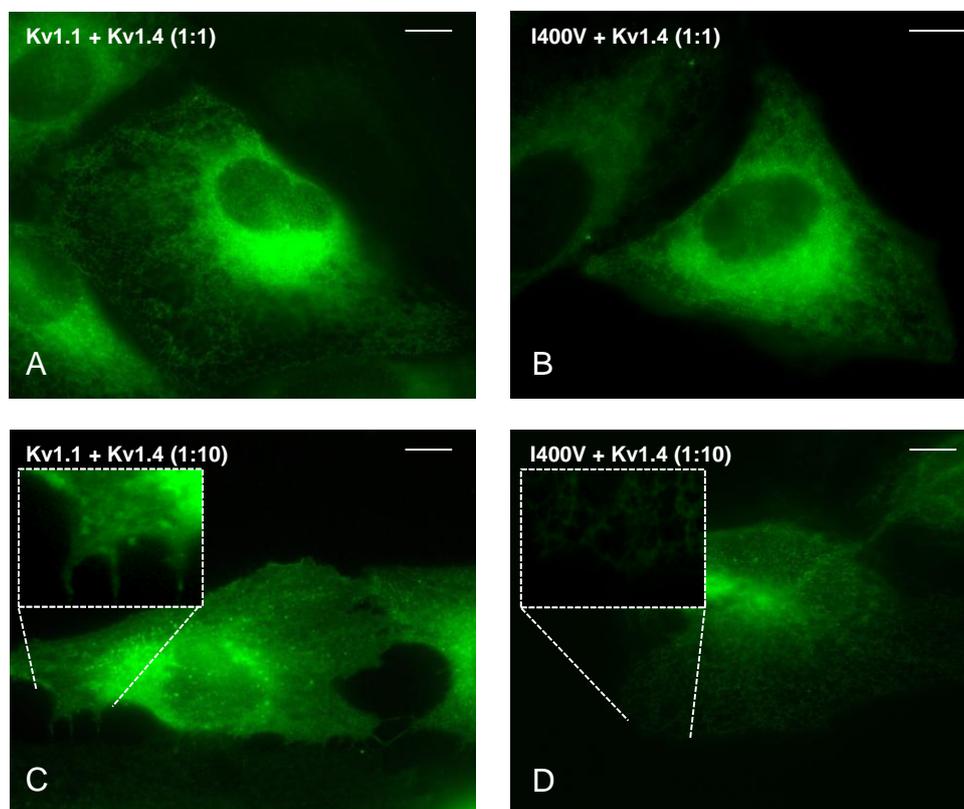


Abb. 3.13: **Zelluläre Lokalisation der nicht editierten und editierten Kv1.1-Untereinheiten in HeLa-Zellen.** Kv1.1- und I400V-Untereinheiten, welche N-terminal mit einem EGFP markiert waren, wurden in verschiedenen Verhältnissen mit nicht markierten Kv1.4-Untereinheiten ko-transfiziert. Nach 24 h wurde die Lokalisation der Untereinheiten mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert. **A, B)** Bei Transfektion von Kv1.1-EGFP bzw. I400V-EGFP und Kv1.4 in einem 1:1 Verhältnis weisen die intrazellulären Kompartimente eine Fluoreszenz auf, es ist keine Fluoreszenz an der Membran zu erkennen. **C)** Bei einem Überschuss an Kv1.4-Untereinheiten (Verhältnis 1:10) können die Kv1.1-Untereinheiten zusätzlich zu den intrazellulären Kompartimenten auch in der Zellmembran nachgewiesen werden. **D)** Die I400V-Untereinheiten können auch bei Überschuss an Kv1.4-Untereinheiten nicht in der Zellmembran nachgewiesen werden, sie sind weiterhin nur intrazellulär nachweisbar. Der Längenstandard zeigt 10  $\mu\text{m}$ . Boxen zeigen vergrößerte Ausschnitte.

Zellmembran transportiert werden. Folglich können bei der Ko-Expression auch Kv1.1-Untereinheiten in der Zellmembran nachgewiesen werden (Manganas & Trimmer, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Transporteigenschaften von Kv1.1- und I400V-Untereinheiten daher anhand von Ko-Expressionen mit Kv1.4-Untereinheiten verglichen. Die Kv1.1- und I400V-Untereinheiten waren dabei mit einem N-terminalen EGFP markiert, während die Kv1.4-Untereinheiten nativ vorlagen. Die Kv1.1-EGFP bzw. I400V-EGFP DNA wurde in verschiedenen Verhältnissen mit Kv1.4-DNA gemischt und das Gemisch für die Transfektion verwendet. Bei einer 1:1 Mischung aus Kv1.1- bzw. I400V-Kanal und dem Kv1.4-Kanal lassen sich sowohl die Kv1.1- als auch die I400V-Untereinheiten nach 24 h Expressionszeit lediglich im ER und perinukleär nachweisen (Abb. 3.13 A und B). Bei einem Überschuss an Kv1.4-Untereinheiten (Verhältnis 1:10) lassen sich Kv1.1-Untereinheiten in der Plasmamembran detektieren, was an einer stellenweisen „Umrandung“ der Zelle und einer diffusen Fluoreszenz der gesamten Zelloberfläche zu erkennen ist (Abb. 3.13 C). Die I400V-Untereinheiten scheinen hingegen die Membran nicht zu erreichen und sind weiterhin nur im ER und perinukleär nachweisbar (Abb. 3.13 D).

Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die frühere Beobachtung, dass eine Ko-Expression mit dem Kv1.4-Kanal die ansonsten geringe Oberflächenexpression des Kv1.1-Kanals erhöht (Abb. 3.13 A und C) (Manganas & Trimmer, 2000). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass der I400V-Kanal bei alleiniger Expression ebenfalls eine geringe Oberflächenexpression aufweist, die jedoch im Gegensatz zum Kv1.1-Kanal durch eine Ko-Expression mit dem Kv1.4-Kanal nicht sichtbar zunimmt (Abb. 3.13 B und D).

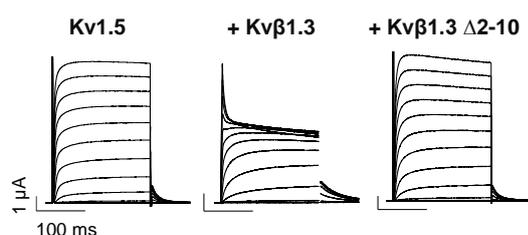
Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie deuten somit ebenso wie die Ergebnisse der Oberflächenexpressionsanalyse (siehe 3.3.4.2) darauf hin, dass die I400V-Editierung das Transportverhalten der Kv1.1-Kanäle innerhalb der Zelle beeinflusst.

### 3.4 Konformation und Regulation des Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikels

Neben der Regulation von Kv1-Kanälen durch RNA Editierung stellte die Untersuchung der A-Typ Inaktivierung einen weiteren wichtigen Aspekt der hier vorliegenden Arbeit dar.

Der Kv1.5-Kanal gehört, wie der Kv1.1-Kanal, zu den verzögerten Gleichrichtern und weist bei heterologer Expression lediglich eine C-Typ Inaktivierung auf. Eine A-Typ Inaktivierung kann durch Ko-Expression mit Kv $\beta$ 1-Untereinheiten hervorgerufen werden. Die Struktur und die Regulationsmechanismen der Inaktivierungspartikel von Kv $\beta$ 1-Untereinheiten sind bisher nur ansatzweise bekannt. Die folgenden Experimente tragen zur Aufklärung der Konformation und Regulation des Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikels bei.

#### 3.4.1 Identifizierung der für die Inaktivierung essentiellen Aminosäuren



**Abb. 3.14: Lokalisation der Inaktivierungsdomäne von Kv $\beta$ 1.3-Untereinheiten.** Der Kv1.5-Kanal weist bei Expression in *Xenopus* Oozyten keine schnelle Inaktivierung auf (links). Durch Ko-Expression des Kv1.5-Kanals mit Kv $\beta$ 1.3-Untereinheiten wird bei hohen Potentialen eine A-Typ Inaktivierung induziert (Mitte). Kv $\beta$ 1.3-Untereinheiten, denen die N-terminalen Aminosäuren 2-10 fehlen, führen bei Ko-Expression mit dem Kv1.5-Kanal keine A-Typ Inaktivierung ein (rechts). Spannungsprotokoll siehe Abb. 3.9 A.

Kv1.5-Kanäle wurden mit oder ohne Kv $\beta$ 1.3-Untereinheiten in *Xenopus* Oozyten exprimiert und die Stromantwort bei Potentialen zwischen -70 mV und +70 mV gemessen (Abb. 3.14). Die Kv $\beta$ 1.3-Untereinheiten führen eine A-Typ Inaktivierung ein, die bei Potentialen oberhalb von +10 mV einsetzt. Diese potentialabhängige A-Typ Inaktivierung blieb jedoch bei Ko-Expression mit Kv $\beta$ 1.3-Untereinheiten denen die N-terminalen Aminosäuren 2-10 (Kv $\beta$ 1.3  $\Delta$ 2-10) fehlten aus (Abb. 3.14, rechts). Dieser Effekt der N-terminalen Deletion wurde bereits von Uebele et al beschrieben (Uebele et al, 1998). Dies deutet darauf hin, dass die ersten zehn

Aminosäuren den Inaktivierungspartikel bilden oder zumindest einen Teil des Partikels darstellen.

### 3.4.2 Phosphoinositide regulieren die Kv $\beta$ 1.3-abhängige Inaktivierung

Die Aminosäuren 2-11 des N-Terminus von Kv $\beta$ 1.3 wurden im Rahmen unserer Studie über den Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikel zunächst, mittels positionsgerichteter Mutagenese, einzeln gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht. Alanine wurden gegen Valin ausgetauscht. Diese mutierten Kv $\beta$ 1.3-Untereinheiten wurden mit dem Kv1.5-Kanal ko-exprimiert und das Ausmaß der durch sie induzierten Inaktivierung untersucht. Während die L2A- und A3V-Austausche zu einem Verlust der A-Typ Inaktivierung führten, führten R5A und T6A eine deutlich stärkere Inaktivierung ein als der Kv $\beta$ 1.3-Wildtyp (Decher *et al*, 2008).

Mein Anteil an dieser Studie bestand vor allem darin, die Rolle des Arginins an Position 5 (R5) zu untersuchen. Daher wird in dieser Arbeit vorwiegend dieser Aspekt der Studie dargestellt.

Das im Kv $\beta$ 1.3-Wildtyp kodierte basische R5 liegt im neutralen pH-Bereich der Zelle in positiv geladener Form vor. Im Vergleich zu den umgebenden Aminosäuren, die neutral und überwiegend unpolar sind, stellt das R5 somit eine Ausnahme innerhalb des Inaktivierungspartikels dar. Die Ko-Expression verschiedener R5-Mutanten der Kv $\beta$ 1.3-Untereinheit mit dem Kv1.5-Kanal sollte Aufschluss über die Bedeutung des R5 für die A-Typ Inaktivierung geben. Wurde das R5 durch die neutralen Aminosäuren Cystein (R5C), Glutamin (R5Q) oder Alanin (R5A) ersetzt, resultierte dies in einer wesentlich stärkeren A-Typ Inaktivierung. Der Austausch gegen das ebenfalls basische Lysin (R5K) hatte hingegen keine signifikante Veränderung der Inaktivierung zur Folge (Abb. 3.15 A). Letzteres ist vermutlich auf die Konservierung der positiven Ladung durch den R5K-Austausch zurückzuführen. Der N-terminale Inaktivierungspartikel des Kv3.4-Kanals besitzt ebenfalls basische Aminosäuren (R13 und K14), deren Austausch gegen neutrale Aminosäuren zu einer stärkeren Inaktivierung des Kanals führt. Dieses Phänomen konnte auf eine Interaktion zwischen den positiv geladenen Aminosäureresten des Kv3.4-Inaktivierungspartikels und den negativ geladenen Phosphatgruppen von Membran-Phosphoinositiden (PIPs) zurückgeführt werden (Oliver *et al*, 2004). Diese Interaktion verhindert das Eindringen des Inaktivierungspartikels in die Kanalpore und vermindert somit das Ausmaß der Inaktivierung. Das hier beobachtete erhöhte Ausmaß an Inaktivierung durch die R5C-, R5Q- und R5A-Mutanten des Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikels könnte daher ebenfalls auf einer verminderten Affinität für PIPs beruhen. In Inside-out Makropatch Messungen (durchgeführt von Prof. Niels Decher, Institut für Physiologie, Universität Marburg) wurde PIP<sub>2</sub> in einer Konzentration von 10  $\mu$ M von der intrazellulären Seite appliziert. Die durch Kv $\beta$ 1.3 induzierte Inaktivierung konnte durch die PIP<sub>2</sub>-Applikation nahezu vollständig antagonisiert werden, während PIP<sub>2</sub> die

Inaktivierung durch Kv $\beta$ 1.3-R5C nur geringfügig reduzierte (Abb. 3.15 B). Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PIP) und Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP<sub>3</sub>), die ebenfalls in der Membran von Säugerzellen vorkommen, wurden auf gleiche Weise und ebenfalls in einer Konzentration von 10  $\mu$ M appliziert. Diese konnten die Inaktivierung durch Kv $\beta$ 1.3 in ähnlichem Maße wie PIP<sub>2</sub> antagonisieren (Abb. 3.15 C). In Bezug auf die Inaktivierung durch Kv $\beta$ 1.3-R5C waren auch PIP und PIP<sub>3</sub> weniger effizient (Decher *et al*, 2008).

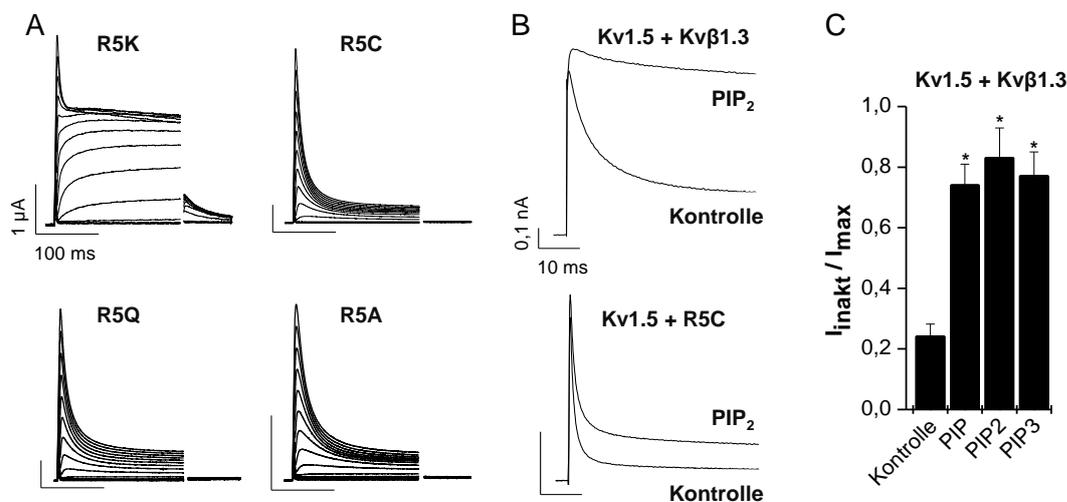


Abb. 3.15: **Phosphoinositide regulieren das Ausmaß der Inaktivierung durch Interaktion mit einem Argininrest der Kv $\beta$ 1.3-Untereinheiten.** **A)** Ko-Expressionen verschiedener Kv $\beta$ 1.3-Mutanten mit dem Kv1.5-Kanal wurden in *Xenopus* Oozyten mittels TEVC gemessen. Der R5K-Austausch verändert die Inaktivierung im Vergleich zum Kv $\beta$ 1.3-WT nicht (vergleiche Abb. 3.14, Mitte). R5C, R5Q und R5A verursachen eine Zunahme der Inaktivierung. **B)** In der Inside-out Makropatch Konfiguration kann durch Applikation von 10  $\mu$ M PIP<sub>2</sub> auf der intrazellulären Seite für eine Dauer von 15 s die Inaktivierung durch Kv $\beta$ 1.3 nahezu vollständig aufgehoben werden (oben). Bei der R5C-Mutante von Kv $\beta$ 1.3 wird die Inaktivierung durch PIP<sub>2</sub> nur zum Teil antagonisiert (unten). **C)** Die Inaktivierung durch Kv $\beta$ 1.3 kann durch 10  $\mu$ M PIP<sub>2</sub> oder durch die gleiche Konzentration an PIP und PIP<sub>3</sub> in ähnlichem Maße antagonisiert werden. Der Wert für den Quotienten aus dem inaktivierten Strom nach 1,5 s Depolarisation ( $I_{inakt}$ ) und dem Peakstrom zu Beginn der Depolarisation ( $I_{max}$ ) wird durch PIP, PIP<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub> signifikant erhöht, was eine Reduktion der Inaktivierung durch die Phosphoinositide widerspiegelt.

### 3.4.3 Der R5C-Austausch führt eine Oxidationssensitivität der Inaktivierung ein

In TEVC-Messungen wurde der Effekt der membrangängigen oxidierenden Substanz t-Butyl-HO<sub>2</sub> auf die A-Typ Inaktivierung durch Kv $\beta$ 1.3 und Kv $\beta$ 1.3-R5C getestet. Die Applikation von 100  $\mu$ M t-Butyl-HO<sub>2</sub> hatte keinen Einfluss auf die Inaktivierung durch Kv $\beta$ 1.3 (Abb. 3.16,

links). Cysteinreste können unter oxidierenden Bedingungen mit anderen Cysteinresten über Disulfidbrücken verbunden werden. Die nahezu vollständige Inaktivierung des Kv1.5-Kanals bei Ko-Expression mit Kv $\beta$ 1.3-R5C wurde durch Applikation von t-Butyl-HO<sub>2</sub> antagonisiert (Abb. 3.16, rechts). Dies resultierte in einer durchschnittlichen Zunahme des Stromes am Ende des 1 s Pulses zu +70 mV um das  $19,2 \pm 3,2$ -fache. Dies zeigt, dass ein Cystein an Position 5 der Kv $\beta$ 1.3-Untereinheit neben der verstärkten Inaktivierung auch eine Sensitivität der Kv $\beta$ 1.3-Untereinheit gegenüber Disulfidbrückenbildung durch Oxidation einfügt. Die in Abb. 3.16 dargestellten Beispielströme wurden jeweils auf die Stromamplitude vor Beginn der Applikation von t-Butyl-HO<sub>2</sub> normalisiert. Die Spitze des Auswärtsstromes und somit die genaue Amplitude ist aufgrund der schnellen Inaktivierungskinetik durch Kv $\beta$ 1.3-R5C in der Abbildung nicht voll erkennbar. Die durch das Cystein an Position 5 eingefügte Sensitivität gegenüber Oxidation durch t-Butyl-HO<sub>2</sub> beruht vermutlich auf einer Disulfidbrückenbildung zwischen den R5C-Resten der einzelnen Kv $\beta$ 1.3-Untereinheiten im Kanalkomplex. Dies kann angenommen werden, da es im Bereich der Pore keine zugänglichen Cysteinreste gibt, die durch die Oxidation beeinflusst werden, bzw. mit den Cysteinen des Inaktivierungspartikels reagieren könnten. Weitere Cysteinmutanten (L2C, A3C und A4C) zeigten kaum oder nur geringe Oxidationssensitivität, während die Inaktivierung durch die T6C-Mutante ebenfalls fast vollständig durch t-Butyl-HO<sub>2</sub> aufgehoben werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Oxidationssensitivität ist somit abhängig von der Position des Cysteins im Inaktivierungspartikel. Die Oxidationssensitivität des Kv $\beta$ 1.3-R5C Inaktivierungspartikels wurde in den folgenden Experimenten genutzt, um die Lokalisation der Aminosäure an Position 5 während der Inaktivierung zu bestimmen.

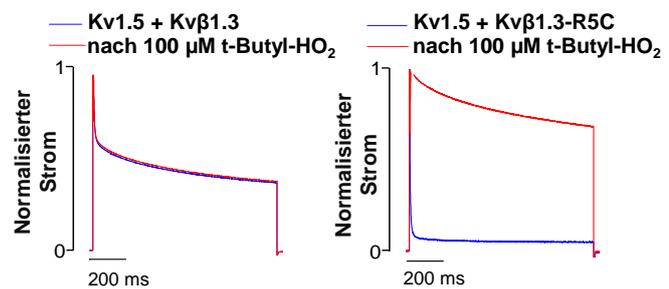


Abb. 3.16: **Oxidation antagonisiert die Inaktivierung durch Kv $\beta$ 1.3-R5C.** Die A-Typ Inaktivierung des Kv1.5-Kanals durch Kv $\beta$ 1.3 bzw. Kv $\beta$ 1.3-R5C wurde mittels Spannungssprüngen zu +70 mV für 1 s, ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV, gemessen. Die Ströme wurden auf die Stromamplitude vor Applikation von t-Butyl-HO<sub>2</sub> normalisiert. Die Inaktivierung des Kv1.5-Kanals durch Kv $\beta$ 1.3 ist vor (blau) und nach Applikation von t-Butyl-HO<sub>2</sub> (rot) identisch (links). Die Inaktivierung durch Kv $\beta$ 1.3-R5C wird durch t-Butyl-HO<sub>2</sub> antagonisiert (rechts).

### 3.4.4 Die Oxidationssensitivität von Kv $\beta$ 1.3-R5C beruht auf der Konformation des Inaktivierungspartikels

Einen weiteren Aspekt unserer Studie über die Kv $\beta$ 1.3-induzierte A-Typ Inaktivierung stellte die Untersuchung der Interaktion zwischen dem Inaktivierungspartikel und der Pore des Kv1.5-Kanals während der Inaktivierung dar. Anhand von Mutationen der Bindungsstelle im Kv1.5-Kanal und Mutationen im Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikel konnten die Kontaktpunkte des Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikel mit dem Kanal identifiziert werden (Abb. 3.18 A). Mein Beitrag zu diesem Teil der Studie bestand vor allem in der Untersuchung der Interaktionen der Aminosäureposition R5 mit der Kanalpore. Die übrigen Daten werden daher nur in Auszügen gezeigt.

Ich konnte zeigen, dass die Aminosäure R5 wahrscheinlich mit den Aminosäuren T480, A501 und V505 der oberen Porenregion des Kanals nahe des Selektivitätsfilters interagiert. Dies impliziert, dass das R5 während der Inaktivierung weit in die Pore eindringt. Im Rahmen unserer Studie zeigten wir, dass die weiter N-terminal gelegene Aminosäure L2 hingegen eine Interaktion mit Aminosäuren der mittleren bis unteren Porenregion (I508 und V512) des Kv1.5-Kanals eingeht (Daten nicht gezeigt). Dies spricht gegen ein Eindringen des Inaktivierungspartikels in die Pore in linearer Form.

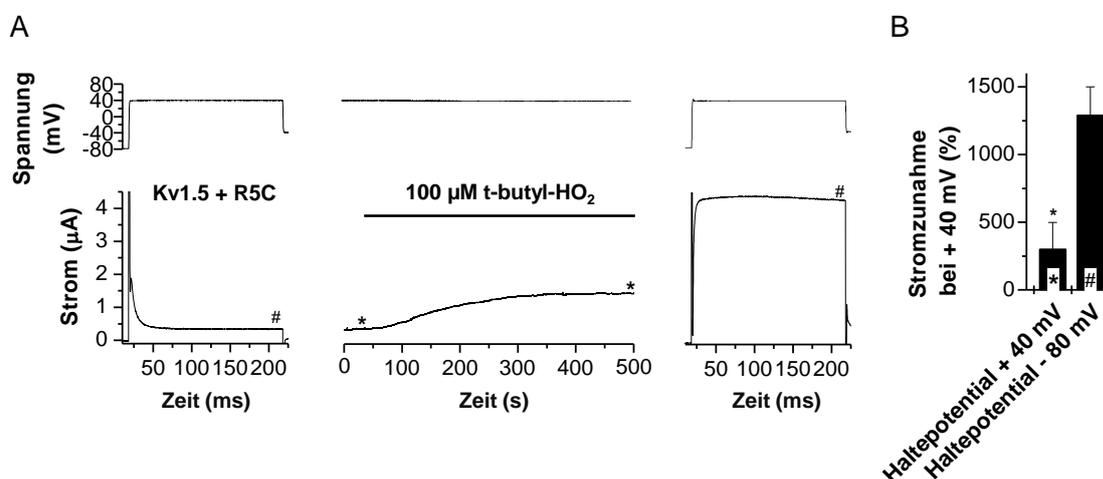


Abb. 3.17: **Die oxidative Modifizierung der Inaktivierung ist vom Aktivierungs- bzw. Inaktivierungszustand des Kanals abhängig.** **A)** TEVC-Messungen des Kv1.5-Kanals ko-exprimiert mit Kv $\beta$ 1.3-R5C. Ausgehend vom Haltepotential (-80 mV) wurden die Kanäle durch einen Spannungspuls zu +40 mV aktiviert (links). Daraufhin wurde die Oozyte dauerhaft bei +40 mV gehalten, sodass die Kanäle in den inaktivierten Zustand versetzt wurden, und mit der Applikation von 100  $\mu$ M t-Butyl-HO<sub>2</sub> begonnen (Mitte). Der Reststrom nach Inaktivierung nimmt unter t-Butyl-HO<sub>2</sub>-Applikation zu (siehe Sterne). Nach Saturierung dieser Stromzunahme wurde die Zelle für 3 min bei -80 mV gehalten bevor erneut ein depolarisierender Puls zu +40 mV appliziert wurde. **B)** Stromzuwachs unter 100  $\mu$ M t-Butyl-HO<sub>2</sub> bei Haltepotentialen von +40 mV (vergleiche A, Sterne) und -80 mV (vergleiche A, Rauten).

Um die Hypothese der Lokalisation des R5 im oberen Porenabschnitt des Kanals zu stützen, wurde die Sensitivität der R5C-Mutante gegenüber Oxidation durch t-Butyl-HO<sub>2</sub> genutzt. Ist das R5C während der Inaktivierung tatsächlich tief in der Kanalpore gelegen, so sollte es in dieser Zeit insensitiv gegenüber der Oxidation sein. Während des Ruhemembranpotentials befindet sich der Inaktivierungspartikel außerhalb der Pore und das R5C sollte somit oxidationssensitiv sein.

In *Xenopus* Oozyten wurde der Kv1.5-Kanal mit Kvβ1.3-R5C ko-exprimiert, sodass mittels TEVC-Messungen die Oxidationssensitivität gemessen werden konnte. Dazu wurde zunächst die A-Typ Inaktivierung vor Applikation von t-Butyl-HO<sub>2</sub> gemessen (Abb. 3.17 A, links). Danach wurden die Zellen dauerhaft auf ein Haltepotential von + 40 mV geklemmt, wodurch die Kanäle in der A-Typ Inaktivierung gehalten wurden. Während dieser Zeit wurde mit der Applikation von 100 μM t-Butyl-HO<sub>2</sub> begonnen. Dies führte zu einer langsamen Stromzunahme, die nach ca. 6 min saturierte (Abb. 3.17 A, Mitte). Daraufhin folgte, unter Fortführung der Applikation von t-Butyl-HO<sub>2</sub>, eine Repolarisation der Zellen für 3 min bei einem Haltepotential von - 80 mV. Dies diente der Deaktivierung der Kanäle und ermöglichte die vollständige Erholung von der Inaktivierung. Die anschließende erneute Aktivierung der Kanäle durch Depolarisation zu + 40 mV resultierte in einem Strom, der keine A-Typ Inaktivierung aufwies (Abb. 3.17 A, rechts).

Während die Stromzunahme durch Oxidation im inaktivierten Zustand des Kanals im Mittel  $300 \pm 199$  % beträgt, steigt die Stromzunahme nach Erholung von der Inaktivierung auf  $1290 \pm 210$  % an (Abb. 3.17 B). Dies zeigt, dass eine Oxidation des Cysteins im Inaktivierungspartikel von Kvβ1.3-R5C im inaktivierten Zustand nur in geringem Maße möglich ist. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass das R5C während der Inaktivierung sehr tief in der 1.5-Kanalpore lokalisiert sein muss.

### 3.4.5 Strukturmodell des Kvβ1.3-Inaktivierungspartikels in der Pore des Kv1.5-Kanals

Die Interaktion des R5 mit der oberen Porenregion und des L2 mit der mittleren bis unteren Porenregion deuten eine gebogene, haarnadelförmige Konformation des Kvβ1.3-Inaktivierungspartikels in der Kanalpore hin. Die Plausibilität dieser Konformationshypothese wurde anhand eines Computermodells geprüft (erstellt von unserem Kollaborationspartner Dr. Frank B. Sachse, Cardiovascular Research and Training Institute, University of Utah, Salt Lake City, USA). Basierend auf der Kristallstruktur des humanen Kv1.2-Kanals wurde ein Porenhomologiemodell des Kv1.5-Kanals erstellt. Die Aminosäuren der Poren-

Bindungsstelle für den Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikel, die aus einer früheren Studie bekannt waren (Abb. 3.18 A und Decher *et al*, 2005) wurden in dem Modell hervorgehoben (Abb. 3.18 B und C). Ein haarnadelförmiges energieoptimiertes Strukturmodell des Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikels wurde erstellt. Das R5 in diesem Modell bildet den äußeren Punkt des Haarnadelbogens. Die kompakte Haarnadelkonformation ermöglicht *in silico* eine Platzierung des Inaktivierungspartikels in der zentralen Kanalpore (Abb. 3.18 B und C). Die anhand der elektrophysiologischen Versuche vorhergesagten Interaktionen zwischen den Aminosäuren des Inaktivierungspartikels und der Kanalpore, beispielweise R5 mit T480, V501 und V505 oder L2 mit I508 und V512, wurden durch das erstellte Modell validiert.

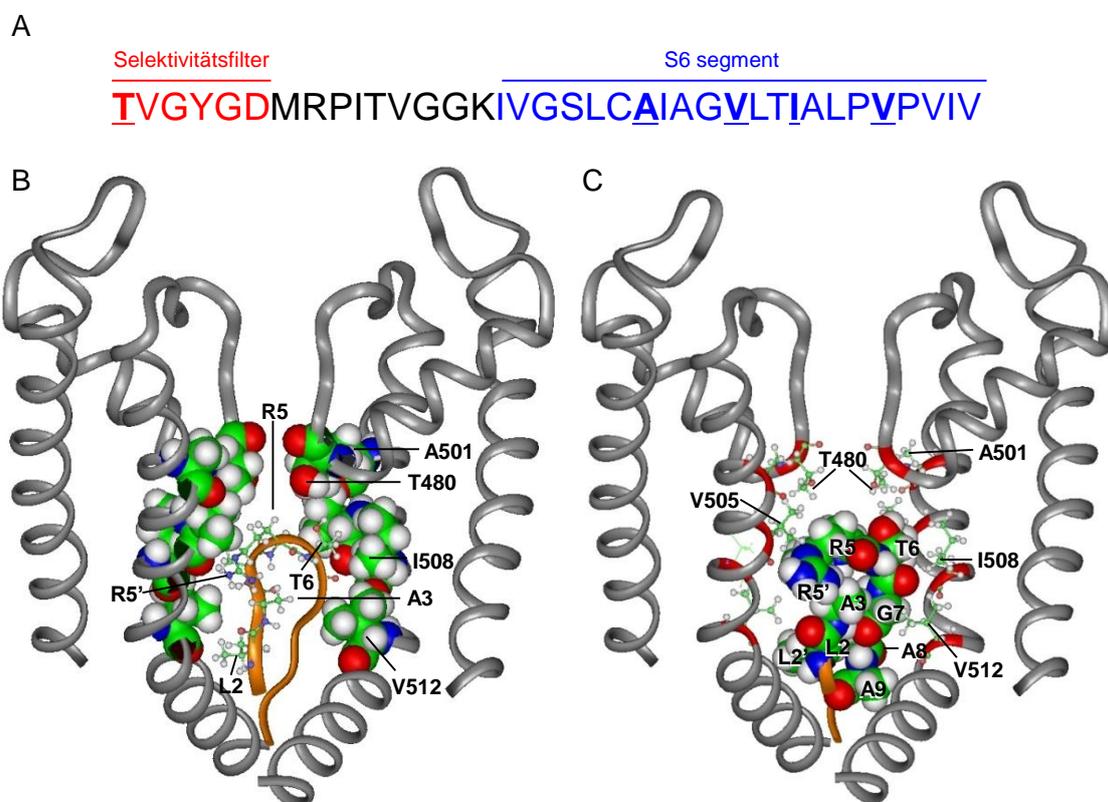


Abb. 3.18: **Strukturmodell des Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikels in der Pore des Kv1.5-Kanals.** **A)** Aminosäuresequenz der Porenregion des Kv1.5-Kanals. Die Aminosäuren der putativen Bindungsstelle für den Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikel sind unterstrichen. **B)** Gezeigt sind die S5- und S6-Segmente zweier Kanaluntereinheiten (grau). Als Kalottenmodelle sind Aminosäuren der Bindungsstelle für den Inaktivierungspartikel dargestellt. Der Inaktivierungspartikel der Kv $\beta$ 1.3-Untereinheit (orange) nimmt eine gebogene Struktur an, die einzelnen Aminosäuren sind als Strichmodelle gezeigt. Das Arginin an Position 5 (R5) befindet sich tief in der Kanalpore. R5' markiert das Ende der Arginin-Seitenkette. **C)** Die Aminosäuren des Inaktivierungspartikels der Kv $\beta$ 1.3-Untereinheit sind als Kalottenmodelle dargestellt, die Aminosäuren der Bindungsstelle im Kanal als Strichmodelle.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Lipide blockieren die innere Kanalpore von Kv-Kanälen

Die Inhibition von Kv-Kanälen durch Lipide ist bereits seit längerem bekannt. Bisher gab es verschiedene Hypothesen bezüglich des Mechanismus der Inhibition. Honoré *et al.* stellten 1994 die Hypothese auf, dass die offene Kanalpore von Kv1.5-Kanälen von der extrazellulären Seite durch die endogenen Fettsäuren Arachidonsäure und Docosahexaensäure blockiert wird (Honoré *et al.*, 1994). Bei Untersuchungen der Inhibition von Kv3.1-Kanälen wurde angenommen, dass Lipide eine Inaktivierung der Kv-Kanäle auslösen, ohne selbst in die zentrale Pore einzudringen (Oliver *et al.*, 2004).

Die initiale Beobachtung, dass die editierte Form des Kv1.1-Kanals (I400V), im Gegensatz zu der nicht editierten Kanalform, gegenüber einer Blockade durch HUFAs resistent ist, warf erneut die Frage nach dem Blockmechanismus auf. Da die editierte Aminosäure (I400) in der Mitte des porenbildenden S6-Segmentes lokalisiert ist, wurde eine direkte Blockade der zentralen Pore durch HUFAs in Betracht gezogen. Experimentell wurde diese Hypothese durch folgende Ergebnisse bestätigt: i) Der Zeitverlauf der Blockade des Kv1.1-Kanals durch Arachidonsäure und Anandamid hängt stark davon ab, ob die Substanzen von intrazellulär oder von extrazellulär appliziert werden. Eine Applikation von der extrazellulären Seite führt zu einem langsamen Einsetzen der Blockade, der maximale Block ist erst nach mehr als 10 min erreicht. Bei Applikation der Substanzen von der intrazellulären Seite wird die maximale Blockade hingegen innerhalb von ~ 30 s erreicht. Folglich blockiert die Substanz den Kanal von intrazellulär. ii) Die transienten Ströme während der Deaktivierung vor und nach Applikation von Arachidonsäure überkreuzen sich, was charakteristisch für ein sogenanntes „Fuß-in-der-Tür“ Phänomen bei Blockern der offenen Pore ist. iii) Arachidonsäure konkurriert mit dem Porenblocker TEA um die Inhibition des Kv1.1-Kanals. iv) Molecular Docking Experimente sagen voraus, dass Anandamid in mehreren möglichen Konformationen innerhalb der zentralen Pore des Kv1.5-Kanals binden und die Passage von hydratisierten K<sup>+</sup>-Ionen durch die Pore verhindern kann.

In meiner Diplomarbeit konnte ferner bereits gezeigt werden, dass v) Arachidonsäure auch mit dem Inaktivierungspartikel von Kvβ1.1 konkurriert, der ebenfalls in der Kanalpore bindet (Streit, 2008). Zudem wurden vi) neben der Kv1.1 Editierungsstelle weitere Aminosäuren im S6-Segment identifiziert, deren Austausch gegen Alanin die Blockierbarkeit durch

Arachidonsäure vermindert und die somit als Teil der Bindungsstelle angesehen werden können (Streit, 2008).

Alle diese Ergebnisse validieren die Hypothese, dass es sich bei der Inhibition von Kv-Kanälen durch Lipide um eine direkte Blockade innerhalb der Kv-Kanalpore handelt, bei der die Kanäle physikalisch blockiert werden und somit für Kaliumionen nicht mehr passierbar sind. Da die Blockade bei Applikation der Arachidonsäure von der intrazellulären Seite wesentlich schneller einsetzt als von extrazellulär, handeltet es sich am ehesten um einen Blockmechanismus, bei dem die Arachidonsäure in gelöster Form im Zytosol vorliegt und von dort in die offene Kanalpore eindringt.

Kv1-Kanäle sind in vielen Arten von Neuronen exprimiert (Jensen *et al*, 2011). Je nach Zelltyp können Kv1.1-Kanäle sowohl im Zellsoma als auch axonal und/oder in Dendriten lokalisiert sein (Wang *et al*, 1994). Dort sind sie vermutlich an der Regulation der Erregbarkeit der Zellen und der Form und Frequenz von Aktionspotentialen beteiligt (Bean, 2007). Unter normalen Bedingungen ist die Konzentration freier Arachidonsäure im Hirngewebe gering. Durch Aktivierung von Phospholipasen ist vermutlich ein Anstieg der freien Arachidonsäure auf eine lokale Konzentration von  $> 50 \mu\text{M}$  möglich (Brash, 2001). In diesem Konzentrationsbereich werden Kv1-Kanäle in hohem Maße blockiert. Die Freisetzung von HUFAs bzw. Anandamid führt zur Blockade von Kv1-Kanälen und trägt somit vermutlich zur Modulation der Aktionspotentialparameter bei. Durch den direkten Zugang der HUFAs zur inneren Pore vom Zytosol aus ist ein schnelles Einsetzen der Blockade bei HUFA Freisetzung möglich. Bei Verringerung der HUFA-Konzentrationen durch enzymatischen Abbau oder aufgrund von Verdünnung durch Diffusion kann die Blockade somit auch schnell wieder abklingen. Änderungen der intrazellulären Konzentration von freien Lipiden könnten daher über ihre Wirkung auf Kv1-Kanäle physiologisch an der schnellen Modulation von Aktionspotentialen beteiligt sein.

## 4.2 Folgen der veränderten Pharmakologie editierter Kv1.1-Kanäle

Die zentrale Kanalpore der Kv1-Kanäle ist stark konserviert und beinhaltet die Bindungsstellen für verschiedene Blockersubstanzen. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl endogene Blocker, wie Lipide und ihnen verwandte Substanzen, als auch synthetische Blocker (4-AP und Psora-4) durch die RNA Editierung des Kv1.1-Kanals in ihrer Potenz gemindert werden.

Obwohl die Kv1-Kanalfamilie acht Mitglieder umfasst, die sich im Bereich der Pore kaum unterscheiden, ist lediglich für die mRNA der Kv1.1-Untereinheit eine RNA Editierung innerhalb der Porenregion beschrieben (Decher *et al*, 2010). Anhand von Ko-Expressionen wurde jedoch gezeigt, dass durch die Möglichkeit der Heteromerisierung verschiedener Untereinheiten prinzipiell alle Mitglieder der Kv1-Familie durch Vorkommen editierter Kv1.1-Untereinheiten in der Zelle beeinflusst werden können. Neuronal sind häufig verschiedene Kv1-Untereinheiten in einer Zelle exprimiert, die als Heteromere nachgewiesen werden können (Coleman *et al*, 1999). Editierte Kv1.1-Untereinheiten in einem solchen Heteromer können nach den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit die Pharmakologie dieser Kanäle beeinflussen.

Die RNA Editierung wird innerhalb der Zelle sowohl auf Ebene der Expression der ADAR-Enzyme als auch posttranslational durch verschiedene Mechanismen reguliert (Nishikura, 2010). Das Ausmaß der Kv1.1 RNA Editierung ist daher gewebsspezifisch und unterscheidet sich selbst zwischen verschiedenen Hirnregionen (Hoopengardner *et al*, 2003; Decher *et al*, 2010). Zusätzlich zu den gewebsspezifischen Unterschieden in der Expression der einzelnen Kv1-Untereinheiten ist somit auch die Kv1.1 Editierung ein bedeutender Faktor für die gewebsspezifische Pharmakologie der funktionellen Kv1-Kanäle, da die  $IC_{50}$ -Werte für bestimmte Substanzen (u.a. 4-AP, Psora-4, Arachidonsäure, DHA, ETYA) durch editierte Untereinheiten in Kv1-Heteromeren stark ansteigen.

Diese veränderte Pharmakologie kann sowohl experimentell als auch physiologisch von Bedeutung sein. Im Rahmen von Experimenten in nativem Gewebe wird häufig von der Veränderung der Stromantwort einer Zelle unter Applikation von Blockersubstanzen auf die Komposition der exprimierten Kanäle geschlossen. Daher kann eine verminderte Sensitivität gegenüber Blockersubstanzen aufgrund der Kv1.1 RNA Editierung zu falschen Schlussfolgerungen bezüglich der Zusammensetzung der gemessenen Kanäle führen, wenn die Editierungsrate nicht bekannt ist. Wird also eine auf pharmakologischen Experimenten basierende Analyse des Expressionsprofils von Ionenkanälen in bestimmten Zellpopulationen angestrebt, muss die RNA Editierung der Kv1.1-Untereinheiten beachtet werden.

Da auch die Blockade durch endogene Substanzen wie Arachidonsäure, Anandamid und Docosahexaensäure durch die Kv1.1 Editierung beeinflusst wird, liegt die Vermutung nahe, dass die Editierung einen physiologischen Regulationsmechanismus der Blockierbarkeit von Kv1-Kanälen durch Lipide darstellt. Je höher die Editierungsrate der Kv1.1-Untereinheiten in einer Zelle bzw. einem Hirnareal ist, desto geringer sollte die Blockierbarkeit der Kv1-Kanäle durch freie HUFAs sein. Neben den bereits erwähnten Effekten auf die A-Typ Inaktivierung

(siehe 1.3.4) besteht daher vermutlich eine weitere physiologische Rolle der Kv1.1 RNA Editierung darin, einer Blockade durch freie HUFAs entgegenzuwirken. Die RNA Editierung der Kv1.1-Untereinheiten stellt somit einen weiteren möglichen Mechanismus zur Regulation der Aktionspotentialform und -frequenz dar.

### 4.3 Grundlage der verminderten Stromamplitude editierter Kv1.1-Kanäle

Die Expression editierter Kv1.1-Kanäle in *Xenopus* Oozyten und humanen Kulturzellen führte im direkten Vergleich mit nicht editierten Kv1.1-Kanälen stets zu signifikant geringeren Stromamplituden. Als molekulare Grundlage für solche Phänomene kommen grundsätzlich vier unterschiedliche Mechanismen in Frage: eine veränderte Spannungsabhängigkeit, veränderte Einzelkanaleigenschaften, verminderte mRNA- bzw. Proteinstabilität und/oder veränderter Transport der Kanäle innerhalb der Zelle. Diese Möglichkeiten wurden in der vorliegenden Studie untersucht. Die Aktivierungskurven nicht editierter und editierter Kv1.1-Kanäle zeigten keine signifikanten Unterschiede, was eine veränderte Spannungsabhängigkeit ausschließt. Ebenso wies keiner der untersuchten Einzelkanalparameter (Leitfähigkeit, Offenwahrscheinlichkeit, mittlere Burst-Dauer) einen signifikanten Unterschied zwischen nicht editierten und editierten Kv1.1-Untereinheiten auf. Jedoch konnte anhand einer Chemilumineszenzanalyse in *Xenopus* Oozyten eine verminderte Oberflächenexpression der editierten Kanaluntereinheiten bei gleicher Gesamtproteinmenge in der Zelle nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass die Stromreduktion auf einem veränderten Transportverhalten der editierten Kv1.1-Kanäle beruht.

Um den intrazellulären Transport der Kanäle in humanen Zellen zu untersuchen, wurde die Lokalisation der Kv1.1- und I400V-Untereinheiten fluoreszenzmikroskopisch erfasst. Beide Kanaltypen können elektrophysiologisch nachgewiesen werden, was ihre Expression in der Zellmembran beweist. Bei alleiniger Expression sind sie jedoch fluoreszenzmikroskopisch nur im Zellinneren und nicht an der Zellmembran nachweisbar. Um dennoch eine Aussage über den Transport treffen zu können, wurden die Kv1.1-Untereinheiten mit Kv1.4-Untereinheiten ko-exprimiert, welche Heteromere mit den Kv1.1-Untereinheiten bilden und diese an die Zellmembran bringen (Zhu *et al*, 2005). Als zugrundeliegender Mechanismus wird dabei eine Maskierung von Retentionssignalen innerhalb der anderen Kanaluntereinheiten im Heteromer durch Kv1.4-Untereinheiten diskutiert (Manganas & Trimmer, 2000). Bei einer Expression von Kv1.1 bzw. I400V mit Kv1.4 im Verhältnis 1:10 konnten die Kv1.1-Untereinheiten in der Zellmembran nachgewiesen werden, während bei

den I400V-Untereinheiten keine Fluoreszenz an der Membran detektiert wurde. Dieses Ergebnis impliziert, dass die editierten Kv1.1-Untereinheiten auch in humanen Zellen eine geringere Tendenz zur Oberflächenexpression besitzen. Diese geringere Oberflächenexpression kann auf einem verminderten Transport der Kanäle zur Membran, d.h. einer Retention in intrazellulären Kompartimenten, beruhen. Eine weitere Möglichkeit stellt ein vermehrter Rücktransport der Kanäle von der Membran ins Zellinnere dar.

Ein wichtiger limitierender Schritt bei der Oberflächenexpression der meisten Membranproteine ist der ER-Export (Ma *et al*, 2001; Jarvis & Zamponi, 2007). Da die Editierungsstelle (I400V) in der Mitte der zentralen Pore lokalisiert ist, scheint eine Auswirkung auf das Transportverhalten des Kanals zunächst recht ungewöhnlich. Meist finden sich die klassischen Transportsignale N- und C-terminal (Deutsch, 2002). Es scheint jedoch auch Aminosäurepositionen im extrazellulären Bereich der Pore von Kv1-Kanälen zu geben, die an der Regulation des ER-Exportes beteiligt sind. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass mindestens drei nicht aufeinander folgende Aminosäurepositionen in der Porenschleife entscheidend für den ER-Export der Kanäle sind (Zhu *et al*, 2005; Manganas *et al*, 2001; Utsunomiya *et al*, 2010). Während der Kv1.4-Kanal an diesen Positionen die Aminosäuren Prolin, Threonin und Lysin besitzt, weist der Kv1.1-Kanal dort Adenosin, Serin und Tyrosin auf (Abb. 4.1). Es wird vermutet, dass es ein ER lokalisiertes Protein gibt, welches diese Aminosäuren binden kann und somit den ER-Export des Kanals beeinflusst (Zhu *et al*, 2005; Manganas *et al*, 2001). Interessanterweise sind diese Aminosäurepositionen teilweise Bestandteil der Bindungsstelle des Polypeptid Neurotoxins  $\alpha$ -Dendrotoxin (DTX). Die Sensitivität des jeweiligen Kv1-Kanals gegenüber DTX korreliert mit der Retention des Kanals im ER. Die DTX sensitiven Untereinheiten Kv1.1, Kv1.2 und Kv1.6 werden im ER zurückgehalten, während die DTX insensitiven Untereinheiten Kv1.3,

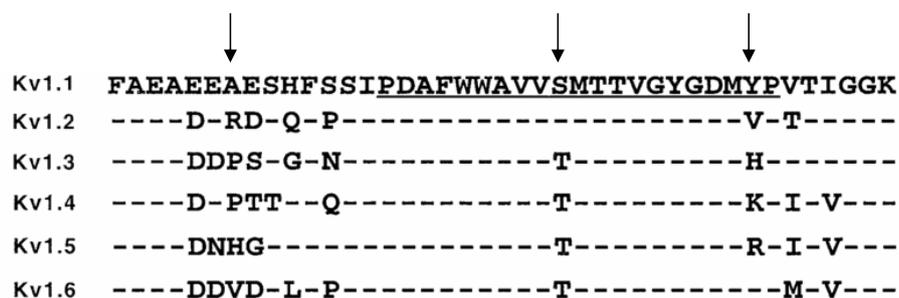


Abb. 4.1: **Vergleich der Aminosäuresequenzen der Porenschleifen innerhalb der Kv1-Kanalfamilie.** Gezeigt ist die vollständige Sequenz des Kv1.1-Kanals im Bereich der Porenschleife, unterstrichen sind die Aminosäuren der tiefen Porenregion. Für die übrigen Kanäle sind nur die von der Kv1.1-Sequenz abweichenden Aminosäuren gezeigt. Die Pfeile markieren die Aminosäurepositionen, welche an der Regulation des ER-Export beteiligt sind. Abbildung modifiziert nach Zhu *et al*, 2005.

Kv1.4 und Kv1.5 effizienter an die äußere Membran transportiert werden (Manganas *et al*, 2001). Da Toxine im Allgemeinen in der äußeren Porenregion binden, wird die Bindung des hypothetischen ER-Proteins auch an der äußeren Pore (zeigt ins ER Lumen) vermutet. Als weitere Möglichkeit wird die Existenz eines ER assoziierten Proteins vermutet, welches von der zytoplasmatischen Seite so weit in die Pore eindringt, dass es mit den Aminosäuren in der Porenschleife interagieren kann (Zhu *et al*, 2005). Letzteres würde bedeuten, dass dieses Protein in der offenen Pore bindet und mit den Aminosäuren innerhalb der zentralen Pore interagieren kann. Da die Editierungsstelle des Kv1.1-Kanals in der Mitte des S6-Segmentes lokalisiert ist und in die zentrale Pore zeigt, wäre dies auch eine mögliche Erklärung des veränderten Transports editierter Kv1.1-Kanäle.

Die akzessorischen Kv $\beta$ -Proteine assemblieren ebenfalls bereits im ER mit den kanalbildenden  $\alpha$ -Untereinheiten. Allen untersuchten Kv $\beta$ -Untereinheiten (Kv $\beta$ 1.1, Kv $\beta$ 1.2, Kv $\beta$ 2 und Kv $\beta$ 3) ist gemeinsam, dass sie den Transport der Kv1-Kanäle zur Membran begünstigen und somit deren Oberflächenexpression erhöhen (Campomanes *et al*, 2002). Die meisten neuronalen Kv1-Kanäle sind mit Kv $\beta$ 2 assoziiert (Shi *et al*, 1996; Rhodes *et al*, 1997). Der Mechanismus der Transportregulation der Kv1-Kanäle durch Kv $\beta$ -Untereinheiten ist bisher nicht geklärt (Campomanes *et al*, 2002). Es wäre daher auch eine Beeinflussung der Kv $\beta$ 2-Interaktion durch die I400V Editierung denkbar.

Weitere Faktoren, die zur Retention von Proteinen im ER führen können, sind unvollständige Faltungen und Modifikationen einzelner Proteinteile oder unvollständige Assemblierungen multimerer Komplexe. Sogenannte Chaperone binden an neu synthetisierte Proteine und unterstützen deren korrekte Faltung. Kann ein Protein nicht korrekt gefaltet werden (dafür gibt es verschiedene Gründe), so wird es markiert, ins Zytoplasma transportiert und durch Proteasomen abgebaut. Auch Kv-Kanäle, bei denen es sich um transmembranäre Proteine handelt, scheinen diesem Schema der Qualitätskontrolle zu unterliegen. Die genauen Abläufe und beteiligten Proteine sind jedoch noch nicht bekannt (Deutsch, 2002). Kv $\beta$ 2 wurde bereits als Chaperon für Kv1-Kanäle diskutiert. Im klassischen Sinne sind Chaperone jedoch nicht mehr am murenen Protein gebunden, was bei Kv $\beta$ 2 jedoch der Fall ist (Shi *et al*, 1996; Deutsch, 2002). Ein Ansatzpunkt für zukünftige Studien wäre demnach zu untersuchen, ob die korrekte Faltung und/oder Assemblierung von Kv1.1-Untereinheiten durch die I400V Editierung beeinflusst wird.

Neurone sind stark polarisierte Zellen, die bei intrazellulärem Transport von Proteinen zwischen Soma, Dendrit und Axon unterscheiden müssen. HeLa-Zellen sind unter den in dieser Arbeit verwendeten Kulturbedingungen nicht polarisiert (Dessus-Babus *et al*, 2008). Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Transporteigenschaften in HeLa-Zellen sind

daher nicht ohne weiteres auf neuronale Zellen übertragbar. Ob die Kv1.1 Editierung Einfluss auf den neuronalen intrazellulären Transport nimmt, muss daher in zukünftigen Versuchen mit neuronalen Zellen überprüft werden.

#### 4.4 Funktionsgewinn oder Funktionsverlust durch die I400V Editierung?

Die Editierung des Kv1.1-Kanals hat sowohl Veränderungen der Pharmakologie als auch der Oberflächenexpression zur Folge. Die verminderte Sensitivität editierter Kanäle gegenüber Kanalblockade durch endogenen HUFAs spricht dafür, dass die Editierung die Kanäle vor einer Inhibition durch HUFAs bewahrt und somit im Falle einer Freisetzung endogener HUFAs der Stromfluss kaum beeinträchtigt wird. Dies wäre eine Art Funktionsgewinn der Kv1-Kanäle durch die Kv1.1 Editierung. Die geringere Oberflächenexpression der I400V-Untereinheiten bringt hingegen einen verminderten Kaliumauswärtsstrom mit sich, was einem Funktionsverlust gleichkommt. Welcher Effekt physiologisch von größerer Bedeutung ist, darüber kann derzeit nur spekuliert werden. Womöglich ist dies zusätzlich abhängig vom jeweiligen Zelltyp und dessen Expressionsprofil.

#### 4.5 Pathologische Relevanz des Kv1.1-Kanals und dessen RNA Editierung

##### 4.5.1 Veränderte RNA Editierungslevel in epileptogenem Gewebe

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass die I400V Editierung die Pharmakologie und die Oberflächenexpression von Kv1-Kanälen beeinflusst. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Kv1.1 Editierungslevel im entorhinalen Cortex chronisch epileptischer Ratten des Kainat-induzierten Modells erhöht sind, was das verminderte iktogene Potential von 4-AP in Hirnschnitten dieser Tiere erklären könnte. Dies ist der erste konkrete Hinweis auf eine pathophysiologische Relevanz der Kv1.1 Editierung. Ob die erhöhten Editierungslevel dabei einen Anteil an der Pathogenese der TLE haben oder ob sie in Folge der Erkrankung entstehen, ist noch unklar. Denkbar wäre, dass die erhöhte RNA Editierung des Kv1.1-Kanals zu einer Reorganisation des entorhinalen Cortex bei chronischer Epilepsie beiträgt. Die verminderte Sensitivität gegenüber Porenblockern könnte einen kompensatorischen Mechanismus darstellen, durch den die Erregbarkeit der Zellen

und somit auch deren Anfälligkeit gegenüber iktogenen Einflüssen herabgesetzt wird. Während die Beeinflussung der 4-AP Sensitivität eher aus pharmakologischer Sicht von Interesse ist, könnte der Sensitivitätsverlust gegenüber der Porenblockade durch Lipide eine pathophysiologisch relevante Rolle spielen.

Welche Rolle die erhöhte Kv1.1 RNA Editierung im epileptischen Gewebe spielt, könnte Gegenstand zukünftiger Studien auf diesem Gebiet sein. Interessant wäre zudem eine Validierung veränderter Kv1.1 Editierungslevel in anderen Tiermodellen der Epilepsie und die Prüfung, ob die Beobachtungen auf den Menschen übertragbar sind. Das Editierungsenzym ADAR2 hat neben dem Kv1.1-Kanal weitere neuronale Zielproteine, darunter die GluR-B Untereinheit des AMPA-Rezeptors und der 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor. Ob auch deren Editierungslevel bei chronischer Epilepsie erhöht sind, ist nicht bekannt.

#### 4.5.2 Funktionsverlust des Kv1.1-Kanals löst Episodische Ataxie aus

Dem Kv1.1-Kanal wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erstmals eine pathophysiologische Relevanz im Krankheitsbild der Epilepsie zugeschrieben. Dies ist jedoch nicht die erste neurologische Erkrankung, mit der der Kv1.1-Kanal in Zusammenhang steht. Mutationen im *KCNA1*-Gen, welches für die Kv1.1- $\alpha$ -Untereinheiten kodiert, wurden erstmals 1994 mit der neuronalen Erkrankung Episodische Ataxie Typ 1 (EA-1) in Verbindung gebracht (Browne *et al*, 1994). Die Symptome dieser Erkrankung umfassen spontane Episoden von Ataxien des Rumpfes und der Extremitäten, teilweise in Kombination mit Übelkeit und Sehstörungen. Diese Episoden können Minuten bis Stunden anhalten und sind bei manchen Patienten durch äußere Reize auslösbar. Zusätzliche Symptome können Myokymien (Muskelzuckungen) geringer Amplitude sein, die zwischen den eigentlichen Episoden auftreten (Rajakulendran *et al*, 2007). Die EA-1 Mutationen im *KCNA1*-Gen führen, soweit untersucht, alle zu einem vollständigen oder teilweisen Funktionsverlust der Kanalfunktion durch Veränderungen der biophysikalischen Eigenschaften, Reduktion der Kanalproteinlevel oder Störungen des intrazellulären Transports. Die Krankheit wird dominant vererbt und alle bisher beschriebenen Patienten sind heterozygot bezüglich ihrer EA-1 Mutation. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Neuronen sowohl Wildtyp- als auch mutierte Untereinheiten des Kv1.1-Kanals exprimieren. Vermutlich haben die mutierten Untereinheiten einen dominant negativen Effekt auf Kanalheteromere (Ashcroft, 2000). Bei der EA-1 handelt es sich nicht um eine Epilepsieform, jedoch wurde eine erhöhte Prävalenz für Epilepsie in Patientenkollektiven mit EA-1 beschrieben (Rajakulendran *et al*, 2007). Sollten die EA-1 Mutationen zu einer Veränderung der Sekundärstruktur der prä-

mRNA führen, könnte dies die Bindung der ADAR und/oder die Effektivität der Editierung beeinflussen. Vor allem solche EA-1 Mutationen, die im Bereich des S6-Segmentes liegen sind hierbei interessant (beispielsweise V404I und V408A), da der entsprechende prä-mRNA Abschnitt an der Bildung der Sekundärstruktur beteiligt ist, die für die I400V RNA Editierung benötigt wird (Bhalla *et al*, 2004). Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob bestimmte EA-1 Mutationen mit einer veränderten I400V Editierungsrate einhergehen.

#### 4.5.3 Problematiken bei der Untersuchung von RNA Editierung

Im Gegensatz zu genetischen Studien, bei denen prinzipiell aus jedem Gewebe des Organismus DNA isoliert und zur Analyse verwendet werden kann, können Untersuchungen zu RNA Editierungsleveln nur durch direkte Isolation des entsprechenden Gewebes durchgeführt werden. Die Untersuchung der pathophysiologischen Relevanz von RNA Editierungsleveln wird durch das hohe Maß an gewebsspezifischen Unterschieden und durch die Instabilität von RNA-Molekülen außerhalb der Zelle erschwert. Präzision bei der Auswahl und Entnahme der Proben sind daher die Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Proben von gesunden Kontrollen und erkrankten Individuen. Zudem ist bisher wenig bekannt über die altersabhängige Entwicklung der Kv1.1 Editierungslevel. Daher können auch die Proben von gesunden und kranken Individuen unterschiedlichen Alters nicht ohne Weiteres verglichen werden. Für den Kv1.1-Kanal sind vor allem neuronale Proben von Interesse. Es ist daher nur schwer realisierbar Studien mit humanem Material durchzuführen.

#### 4.6 Evolutionäre Konservierung der Kv1.1 Editierungsstelle

Die Kv1-Familie in Säugern ist paralog zum *Shaker*-Kanal der *Drosophila* Fliege. Die der I400-Position entsprechende Stelle des *Shaker*-Kanals unterliegt ebenfalls einer RNA Editierung mit der Folge eines Aminosäureaustausches zu Valin (Bhalla *et al*, 2004). Ebenso verhält es sich mit dem paralogen Kv1.1-Kanal der Ratte. Dass diese Editierung in verschiedenen Spezies auftritt, spricht für eine evolutionäre Konservierung. Diese ist meist Anzeichen einer wichtigen Funktion der betroffenen Gene für den Organismus. Erstaunlicherweise wird der *Drosophila*-Kanal *Shab*, welcher paralog zur Kv2-Kanalfamilie ist, auch an der I400-Position editiert. Für den humanen Kv2-Kanal wurde bei der Untersuchung verschiedener Gewebe (Cerebellum, frontaler Cortex, Corpus Callosum, Diencephalon, Dünndarm, Niere und Nebenniere) bisher keine entsprechende Editierung

beschrieben (Li *et al*, 2009). Durch heterologe Expression nicht editierter und editierter *Shaker*- und *Shab*-Kanäle konnte gezeigt werden, dass auch bei diesen Kanälen die Editierung zu einer verminderten Lipidsensitivität führt (Daten nicht gezeigt).

## 4.7 Konformation und Regulation des Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikels

### 4.7.1 Konformation des Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikels

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Inaktivierungspartikel der Kv $\beta$ 1.3-Untereinheit in einer haarnadelförmigen gebogenen Konformation vorliegt, wenn er während der A-Typ Inaktivierung in der zentralen Pore von Kv1-Kanälen bindet. Eine ähnliche Konformation wurde zuvor für die endogenen Inaktivierungspartikel von Kv1.4- und Kv3.4-Kanälen vorhergesagt (Antz *et al*, 1997), während für den N-Terminus der Kv $\beta$ 1.1-Untereinheit ein Eindringen in die Kanalpore in einer linearen, ausgestreckten Konformation vermutet wird (Zhou *et al*, 2001b). Trotz der ähnlichen Effekte der verschiedenen Inaktivierungspartikel auf die Kv1-Kanäle sind natürlich abweichende Konformationen aufgrund der unterschiedlichen Aminosäuresequenzen möglich.

### 4.7.2 Regulation des Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikels

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde erstmalig eine Regulation der Kv $\beta$ 1.3-induzierten Inaktivierung durch Phosphoinositide (PIP, PIP<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub>) beschrieben. Diese beruht auf einer Interaktion des positiv geladenen Argininrestes an Position 5 (R5) des N-terminalen Inaktivierungspartikels mit den negativen Phosphatgruppen der Phosphoinositide. Der gleiche Mechanismus wurde zuvor für die Inaktivierungspartikel des Kv3.4-Kanals und der Kv $\beta$ 1.1-Untereinheit beschrieben. Im Kv3.4-Kanal befinden sich die für die PIP<sub>2</sub>-Interaktion verantwortlichen positiv geladenen Aminosäuren weiter vom N-Terminus entfernt (R13 und K14) (Abb. 4.2) (Oliver *et al*, 2004). Im Kv $\beta$ 1.1-Protein ist die erste negativ geladene Aminosäure des N-Terminus ein Lysin an Position 13 (K13). Ob das K13 für die PIP<sub>2</sub>-Sensitivität essentiell ist, wurde bisher nicht beschrieben. Im Kv1.4-Kanal befinden sich die ersten basischen Aminosäuren an den Positionen 26 und 28. Für diesen Kanal wurde jedoch ebenfalls eine PIP<sub>2</sub>-Regulation gezeigt (Oliver *et al*, 2004). Für die Kv $\beta$ 1.2-Untereinheit ist bisher nicht beschrieben, ob sie PIP<sub>2</sub> reguliert ist, sie weist jedoch analog zu

Kv $\beta$ 1.3 an Position 5 eine negative Ladung auf (K5) (Abb. 4.2). Erste eigene Versuche (nicht Teil der hier vorliegenden Arbeit) deuten auf eine K5-abhängige PIP<sub>2</sub>-Regulation der Kv $\beta$ 1.2-induzierten A-Typ Inaktivierung hin. Die unterschiedlichen Lokalisationen N-terminaler basischer Aminosäuren in den PIP-regulierten Inaktivierungspartikeln lassen vermuten, dass es keine generell konservierte PIP-Interaktionssequenz gibt. Die Regulation der Inaktivierungspartikel durch PIPs kann daher individuelle Unterschiede aufweisen und muss für jeden Inaktivierungspartikel einzeln untersucht werden.

Abb. 4.2: **Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen humaner Kv $\beta$ 1-Untereinheiten und Kv-Kanäle mit A-Typ Inaktivierung.** Die basischen Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) sind fettgedruckt. Umrandungen markieren experimentell (von mir bzw. Oliver *et al*, 2004) validierte PIP<sub>2</sub>-Interaktionsstellen (h = human).

	5	10	15	20	25	
hKv $\beta$ 1.1	MQVSI	ACTEHN	L <b>KSR</b>	NGED	RLLS <b>K</b>	QSST → PIP <sub>2</sub>
hKv $\beta$ 1.2	MHLY	<b>K</b> PACAD	I <b>P</b> SP <b>K</b>	LGLP	<b>K</b> SSES	AL <b>K</b> C → ?
hKv $\beta$ 1.3	MLAA	<b>R</b> TGAAG	SQISE	ENT <b>K</b> L	<b>RR</b> QSG	F <b>S</b> V → PIP <sub>2</sub>
hKv1.4	MEVAM	VSAESS	GCNSH	MPYGY	AAQ <b>AR</b>	<b>AR</b> → PIP <sub>2</sub>
hKv4.3	MISSV	CVSSY	<b>R</b> <b>R</b> <b>K</b>	SGN <b>K</b>	PP <b>S</b> <b>K</b>	T <b>C</b> L <b>K</b> E <b>E</b> → PIP <sub>2</sub>

#### 4.7.3 Regulation der membranären PIP-Level

Physiologisch liegen PIPs in Membranen integriert vor und stehen unter dem Einfluss zellulärer Phosphatasen, Lipasen und Kinasen. Die Aktivierung G<sub>q</sub>-gekoppelter Rezeptoren initiiert eine Signaltransduktionskaskade, die zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt. Die PLC spaltet PIP<sub>2</sub> zu Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>), sodass die PIP<sub>2</sub>-Konzentration in der Membran abnimmt. Durch Phosphatasen können auch einzelne Phosphate von PIPs abgespalten werden, was ebenfalls Einfluss auf die Interaktion mit Inaktivierungspartikeln nehmen könnte. Verschiedene zelluläre Kinasen können diesen Prozess antagonisieren indem sie Phosphoinositol (PI) bzw. PIPs weiter phosphorylieren. In den bisher publizierten Studien wurde die PIP-Bindung durch Inaktivierungspartikel meist indirekt nachgewiesen. So wurden beispielsweise PIP<sub>2</sub> oder PIP<sub>2</sub> maskierendes Polylysin in elektrophysiologischen Messungen intrazellulär appliziert (Oliver *et al*, 2004; Decher *et al*, 2008) oder die Bindung isolierter Inaktivierungspartikel an PIP-haltige Liposomen *in vitro* anhand von biochemischen Tests nachgewiesen (Oliver *et al*, 2004; Decher *et al*, 2008). In zukünftigen Studien wäre es erstrebenswert zu testen, ob die durch Kinasen und Phosphatasen erzeugten Änderungen der PIP-Level in der Membran ausreichen, um eine signifikante Änderung der Inaktivierung hervorzurufen.

#### 4.7.4 Physiologische Relevanz der Regulation der A-Typ Inaktivierung

Kv1-Kanäle sind in vielen Geweben gemeinsam mit akzessorischen Kv $\beta$ 1-Untereinheiten exprimiert: Neuronal wurden bereits in mehreren Studien Kollokationen und Interaktionen von Kv1-Kanälen mit Kv $\beta$ 1-Untereinheiten beschrieben (Rhodes *et al*, 1997; Sokolowski *et al*, 2005). Im Herzen bilden wahrscheinlich Kv $\beta$ 1.2 und Kv $\beta$ 1.3 Komplexe mit Kv1.5-Kanälen, diese Kanalkomplexe könnten an der transienten Kalium-Stromkomponente  $I_{to}$  (engl.: „transient outward“) und/oder der ultraschnell aktivierenden Komponente  $I_{Kur}$  (engl.: „K<sup>+</sup> ultra rapid“) des Aktionspotentials im Herzen beteiligt sein (Snyders, 1999; Ravens & Wettwer, 2011). Da diese Stromkomponenten an der Repolarisation und daher an der Regulation der Aktionspotentialdauer (engl.: „action potential duration“; APD) beteiligt sind, hat eine schnelle Inaktivierung der Kanäle durch Kv $\beta$ 1-Untereinheiten potentiell ebenfalls einen Effekt auf die APD. Die Regulation der A-Typ Inaktivierung durch PIPs könnte somit physiologisch an der Modulation von APDs und Aktionspotentialfrequenzen beteiligt sein. In Kardiomyozyten humaner Vorhöfe ist die  $I_{Kur}$ -Stromkomponente besonders ausgeprägt. Eine signifikante Verminderung dieses Stromes konnte mit Vorhofflimmern in Verbindung gebracht werden (Brandt *et al*, 2000; Van Wagoner & Nerbonne, 2000; Christ *et al*, 2008). Veränderte Expression von Kv $\beta$ -Untereinheiten wurden in diesem Zusammenhang bisher jedoch nicht nachgewiesen (Ravens & Wettwer, 2011). Ein Zusammenhang zwischen veränderten PIP<sub>2</sub>-Leveln und Arrhythmien wird ebenfalls bereits diskutiert (Woodcock *et al*, 2009). PIP<sub>2</sub>-Effekte auf die A-Typ Inaktivierung von Kv1.5-Kanälen wurden dabei bisher außer Acht gelassen.

Auch in Neuronen könnte die Regulation der A-Typ Inaktivierung von Kv1-Kanälen durch PIP<sub>2</sub> an der Modulation der Aktionspotentialdauer, -weiterleitung und -frequenz beteiligt sein. Die physiologische Bedeutung dieser Modulation ist vermutlich stark von der jeweiligen Hirnregion abhängig und bedarf daher genauer Untersuchung in künftigen Studien.

Die Untersuchung der physiologischen Funktion von PIPs im Zusammenhang mit A-Typ Inaktivierung von Kv1-Kanälen wird dadurch erschwert, dass PIPs an der Regulation vieler Ionenkanäle beteiligt sind, sodass die Isolation des Effekts auf einzelne Stromkomponenten bei Messungen in nativem Gewebe vermutlich nur schwer realisierbar ist.

## 4.8 Ausblick

Die in dieser Arbeit beschriebenen Auswirkungen der RNA Editierung des Kv1.1-Kanals auf die Pharmakologie und den Transport der Kanäle stellen neue Aspekte der Regulation von Kv1-Kanälen dar. Verschiedene Aspekte weisen auf die hohe physiologische Relevanz der Kv1.1 Editierung hin: Bhalla *et al* konnten eine evolutionäre Konservierung der Kv1.1 Editierung zeigen (Bhalla *et al*, 2004). Wir konnten gewebsspezifisch unterschiedliche Editierungslevel (Daten nicht gezeigt, siehe Decher *et al*, 2010) und einen Anstieg der Kv1.1 Editierungslevel im entorhinalen Cortex epileptischer Ratten nachweisen (siehe 3.2). Zudem zeigen die veränderten Editierungslevel der GluR-B Untereinheit und des 5HT<sub>2C</sub>-Rezeptors bei sALS-Patienten (siehe 1.3.3.1) bzw. Suizidopfern (siehe 1.3.3.2), dass neuronale RNA Editierungslevel im Menschen eine bedeutende Krankheitsrelevanz besitzen. Es wäre daher interessant, eine Quantifizierung der RNA Editierung des Kv1.1-Kanals in zukünftige Studien zur Erforschung neuronaler Erkrankungen einzubeziehen.

Um die Folgen der Kv1.1 Editierung auch auf zellulärer Ebene besser zu verstehen, wäre eine weiterführende Untersuchung der veränderten Oberflächenexpression editierter Kanaluntereinheiten sinnvoll. Eine Verifizierung der Transporteffekte in neuronalen Zellen und eine anschließende Aufklärung des zugrundeliegenden Transportmechanismus sind hierbei erstrebenswert.

Auf dem Gebiet der A-Typ Inaktivierung könnte in zukünftigen Studien die Regulation durch PIPs genauer untersucht werden. Alle in dieser Arbeit diskutierten Inaktivierungspartikel scheinen durch PIPs regulierbar zu sein. Eine offene Frage ist, ob die unterschiedlichen Sequenzen der Inaktivierungspartikel verschiedene Interaktionsbedingungen für PIPs aufweisen. Es wäre daher interessant die Antagonisierung der Inaktivierung für die verschiedenen Inaktivierungspartikel auf ihre jeweilige Konzentrationsabhängigkeit von PIPs zu testen. Dies würde zu einem besseren Verständnis der regulatorischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Inaktivierungspartikeln führen. Zudem wäre es erstrebenswert in künftigen Studien die zellulären Regulationsmechanismen (Lipasen, Phosphatasen, Kinasen) der membranären PIP-Level zu nutzen, um herauszufinden, in welchem Ausmaß die kardiale und neuronale A-Typ Inaktivierung durch PIPs physiologisch beeinflusst werden kann.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

- Aiyar J, Withka JM, Rizzi JP, Singleton DH, Andrews GC, Lin W, Boyd J, Hanson DC, Simon M, Dethlefs B, Lee C, Hall JE, Gutman GA & Chandy G (1995) Topology of the pore-region of a K<sup>+</sup> channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. *Neuron* **15**:1159-81
- Antz C, Geyer M, Fakler B, Schott MK, Guy HR, Frank R, Ruppersberg JP & Kalbitzer HR (1997) NMR structure of inactivation gates from mammalian voltage-dependent potassium channels. *Nature* **385**: 272-5
- Armstrong CM (1971) Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *The Journal of General Physiology* **58**: 413-37
- Ashcroft FM (2000) Ion Channels and Disease. *Academic Press*
- Barten LJ, Allington DR, Procacci KA & Rivey MP (2010) New approaches in the management of multiple sclerosis. *Drug Design, Development and Therapy* **4**: 343-66
- Bean BP (2007) The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews Neuroscience* **8**: 451-65
- Beeton C & Chandy KG (2005) Potassium channels, memory T cells, and multiple sclerosis. *The Neuroscientist* **11**: 550-62
- Benne R, Burg JVD, Boom JV & Tromp MC (1986) Major Transcript of the Frameshifted coxII Gen Trypanosome Mitochondria Contains otides That Are Not Encoded in the. *Cell* **46**: 819-26
- Berg KA, Cropper JD, Niswender CM, Sanders-Bush E, Emeson RB & Clarke WP (2001) RNA-editing of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor alters agonist-receptor-effector coupling specificity. *British Journal of Pharmacology* **134**: 386-92
- Bezannilla F (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiological Reviews* **80**: 555-92
- Bhalla T, Rosenthal JJC, Holmgren M & Reenan R (2004) Control of human potassium channel inactivation by editing of a small mRNA hairpin. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**: 950-6
- Boland LM, Drzewiecki MM, Timoney G & Casey E (2009) Inhibitory effects of polyunsaturated fatty acids on Kv4/KChIP potassium channels. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **296**: 1003-14
- Bouchard R & Fedida D (1995) Closed- and Open-State Binding of 4-Aminopyridine to the Cloned Human Potassium Channel Kv1.5. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **275**: 864-76

- Brandt MC, Priebe L, Böhle T, Südkamp M & Beuckelmann DJ (2000) The ultrarapid and the transient outward  $K^+$  current in human atrial fibrillation. Their possible role in postoperative atrial fibrillation. *The Journal of Molecular Cell Cardiology* **32**: 1885-96
- Brash AR (2001) Prostaglandins and their precursors Arachidonic acid as a bioactive molecule. *The Journal of Clinical Investigation* **107**: 1339-45
- Browne DL, Gancher ST, Nutt JG, Brunt ERP, Smith EA, Kramer P & Litt M (1994) Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, *KCNA1*. *Nature Genetics* **8**: 136-40
- Brusa R, Zimmermann F, Koh DS, Feldmeyer D, Gass P, Seeburg PH & Sprengel R (1995) Early-Onset Epilepsy and Postnatal Lethality Associated GluR-B Allele in Mice. *Science* **270**: 1677-80
- Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH & Sakmann B (1992) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* **8**: 189-98
- Burns CM, Chu H, Rueter SM, Hutchinson LK, Canton H, Sanders-Bush E & Emeson RB (1997) Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature* **387**: 303-8
- Campomanes CR, Carroll KI, Manganas LN, Hershberger ME, Gong B, Antonucci DE, Rhodes KJ & Trimmer JS (2002) Kv beta subunit oxidoreductase activity and Kv1 potassium channel trafficking. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 8298-305
- Chen CX, Cho DS, Wang Q, Lai F, Carter KC & Nishikura K (2000) A third member of the RNA-specific adenosine deaminase gene family, ADAR3, contains both single- and double-stranded RNA binding domains. *RNA* **6**: 755-67
- Choi KL, Mossman C, Jeffrey A & Yellen G (1993) The Internal Quaternary Ammonium Receptor Site of *Shaker* Potassium Channels. *Neuron* **10**: 533-41
- Choquet D & Korn H (1992) Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. *The Journal of General Physiology* **99**: 217-40
- Christ T, Wettwer E, Voigt N, Hála O, Radicke S, Matschke K, Várro A, Dobrev D & Ravens U (2008) Pathology-specific effects of the  $I_{Kur}/I_{to}/I_{K,Ach}$  blocker AVE0118 on ion channels in human chronic atrial fibrillation. *The British Journal of Pharmacology* **154**: 1619-30
- Claydon TW, Vaid M, Rezazadeh S, Kehl SJ & Fedida D (2007) 4-Aminopyridine Prevents the Conformational Changes Associated with P/C-Type Inactivation in *Shaker* Channels. *Pharmacology* **320**: 162-72
- Coleman SK, Newcombe J, Pryke J & Dolly JO (1999) Subunit composition of Kv1 channels in human CNS. *Journal of Neurochemistry* **73**: 849-58

- Decher N, Kumar P, Gonzalez T, Renigunta V & Sanguinetti MC (2005) Structural Basis for the Competition between Drug Binding and Kv $\beta$ 1.3 Accessory Subunit-Induced N-Type Inactivation of Kv1.5 Channels. *Molecular Pharmacology* **68**: 995-1005
- Decher N, Gonzalez T, Streit AK, Sachse FB, Renigunta V, Soom M, Heinemann SH, Daut J & Sanguinetti MC (2008) Structural determinants of Kv $\beta$ 1.3-induced channel inactivation: a hairpin modulated by PIP<sub>2</sub>. *The EMBO Journal* **27**: 3164-74
- Decher N, Kumar P, Gonzalez T, Pirard B & Sanguinetti MC (2006) Binding Site of a Novel Kv1.5 Blocker: A "Foot in the Door" against Atrial Fibrillation. *Molecular Pharmacology* **70**: 1204-11
- Decher N, Streit AK, Rapedius M, Netter MF, Marzian S, Ehling P, Schlichthörl G, Craan T, Renigunta V, Köhler A, Dodel RC, Navarro-Polanco RA, Preisig-Müller R, Klebe G, Budde T, Baukrowitz T & Daut J (2010) RNA editing modulates the binding of drugs and highly unsaturated fatty acids to the open pore of Kv potassium channels. *The EMBO Journal* **29**: 2101-13
- Dessus-Babus S, Moore CG, Whittimore JD & Wyrick PB (2008) Comparison of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 growth in polarized genital epithelial cells grown in three-dimensional culture with non-polarized cells. *Microbes and Infection* **10**: 563-70
- Deutsch C (2002) Potassium channel ontogeny. *Annual Review of Physiology* **64**: 19-46
- Doyle DA (1998) The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity. *Science* **280**: 69-77
- Dracheva S, Elhakem SL, Marcus SM, Siever LJ, McGurk SR & Haroutunian V (2003) RNA editing and alternative splicing of human serotonin 2C receptor in schizophrenia. *Journal of Neurochemistry* **87**: 1402-12
- England SK, Uebele VN, Kodali J, Bennett PB & Tamkun MM (1995) A Novel K<sup>+</sup> Channel  $\beta$ -Subunit. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 28531-4
- Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M & Lazdunski M (1998) A neuronal two P domain K<sup>+</sup> channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *The EMBO Journal* **17**: 3297-308
- Fitzgerald LW, Iyer G, Conklin DS, Krause CM, Marshall A, Patterson JP, Tran DP, Jonak GJ & Hartig PR (1999) Messenger RNA Editing of the Human Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> Receptor. *Neuropsychopharmacology* **21**: 82-90
- Franks NP & Honoré E (2004) The TREK K<sub>2P</sub> channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. *Trends in Pharmacological Sciences* **25**: 601-8
- Gardiner K & Du Y (2006) A-to-I editing of the 5HT<sub>2C</sub> receptor and behaviour. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* **5**: 37-42

- Gijón MA & Leslie CC (1999) Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> activation. *Journal of Leukocyte Biology* **65**: 330-6
- Gu C, Jan YN & Jan LY (2003) A conserved domain in axonal targeting of Kv1 (Shaker) voltage-gated potassium channels. *Science* **301**: 646-9
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, Mckinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stu W & Wang X (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacological Reviews* **57**: 473-508
- von Heijne G (1991) Proline kinks in transmembrane alpha-helices. *Journal of Molecular Biology* **218**: 499-503
- Heinemann SH, Rettig J, Graack HR & Pongs O (1996) Functional characterization of Kv channel  $\beta$ -subunits from rat brain. *The Journal of Physiology* **493.3**: 625-33
- Herrick-Davis K, Grinde E & Niswender CM (1999) Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor RNA editing alters receptor basal activity: implications for serotonergic signal transduction. *Journal of Neurochemistry* **73**: 1711-7
- Higuchi M, Maas S, Single FN, Hartner J, Rozov A, Burnashev N, Feldmeyer D, Sprengel R & Seeburg PH (2000) Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature* **406**: 78-81
- Higuchi M, Single FN, Köhler M, Sommer B, Sprengel R & Seeburg PH (1993) RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell* **75**: 1361-70
- Honoré E, Barhanin J, Attali B, Lesage F & Lazdunski M (1994) External blockade of the major cardiac delayed-rectifier K<sup>+</sup> channel (Kv1.5) by polyunsaturated fatty acids. *PNAS* **91**: 1937-41
- Hoopengardner B, Bhalla T, Staber C & Reenan R (2003) Nervous system targets of RNA editing identified by comparative genomics. *Science* **301**: 832-6
- Hoshi T, Zagotta WN & Aldrich RW (1991) Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* **7**: 547-56
- Iwamoto K, Bundo M & Kato T (2009) Serotonin receptor 2C and mental disorders: genetic, expression and RNA editing studies. *RNA Biology* **6**: 248-53
- Jarvis SE & Zamponi GW (2007) Trafficking and regulation of neuronal voltage-gated calcium channels. *Current Opinion in Cell Biology* **19**: 474-82
- Jensen CS, Rasmussen HB & Misonou H (2011) Neuronal trafficking of voltage-gated potassium channels. *Molecular and Cellular Neuroscience* **48**: 288-97
- Jow F, Zhang ZH, Kopsco DC, Carroll KC & Wang K (2004) Functional coupling of intracellular calcium and A-type K<sup>+</sup> channels. *PNAS* **101**: 15535-40

- Judge SIV & Bever CT (2006) Potassium channel blockers in multiple sclerosis: neuronal Kv channels and effects of symptomatic treatment. *Pharmacology Therapeutics* **111**: 224-59
- Kamb A, Iverson LE & Tanouye MA (1987) Molecular characterization of *Shaker*, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. *Cell* **50**: 405-13
- Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I & Kwak S (2004) Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* **427**: 801
- Keegan LP, Gallo A & O'Connell MA (2001) The many roles of an RNA editor. *Nature Reviews Genetics* **2**: 869-78
- Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi a, Ozato K & Wahli W (1993) Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *PNAS* **90**: 2160-4
- Kurata HT & Fedida D (2006) A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **92**: 185-208
- Labro AJ, Grottesi A, Sansom MSP, Raes AL & Snyders DJ (2008) A Kv channel with an altered activation gate sequence displays both “fast” and “slow” activation kinetics. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **294**: 1476-84
- Leicher T, Bähring R, Isbrandt D & Pongs O (1998) Coexpression of the *KCNA3B* gene product with Kv1.5 leads to a novel A-type potassium channel. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 35095-101
- Lenaeus MJ, Vamvouka M, Focia PJ & Gross A (2005) Structural basis of TEA blockade in a model potassium channel. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**: 454-9
- Li JB, Levanon EY, Yoon JK, Aach J, Xie B, Leproust E, Zhang K, Gao Y & Church GM (2009) Genome-wide identification of human RNA editing sites by parallel DNA capturing and sequencing. *Science* **324**: 1210-3
- Li M, Jan YN & Jan LY (1992) Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* **257**: 1225-30
- Long SB, Campbell EB & Mackinnon R (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science* **309**: 897-903
- Ma D, Zerangue N, Lin YF, Collins A, Yu M, Jan YN & Jan LY (2001) Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* **291**: 316-9
- Maas S (2010) Gene regulation through RNA editing. *Discovery Medicine* **10**: 379-86
- Maas S & Rich A (2000) Changing genetic information through RNA editing. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **22**: 790-802
- Maas S, Rich A & Nishikura K (2003) A-to-I RNA editing: recent news and residual mysteries. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 1391-4

- MacKinnon R & Yellen G (1990) Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Science* **250**: 276-9
- Manganas LN & Trimmer JS (2000) Subunit composition determines Kv1 potassium channel surface expression. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 29685-93
- Manganas LN, Wang Q, Scannevin RH, Antonucci DE, Rhodes KJ & Trimmer JS (2001) Identification of a trafficking determinant localized to the Kv1 potassium channel pore. *PNAS* **98**: 14055-9
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC & Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* **372**: 686-91
- Maydanovych O & Beal PA (2006) Breaking the central dogma by RNA editing. *Chemical Reviews* **106**: 3397-411
- Mckeown L, Burnham MP, Hodson C & Jones OT (2008) Identification of an evolutionarily conserved extracellular threonine residue critical for surface expression and its potential coupling of adjacent voltage-sensing and gating domains in voltage-gated potassium channels. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 30421-32
- Molina A, Castellano AG & López-Barneo J (1997) Pore mutations in Shaker K<sup>+</sup> channels distinguish between the sites of tetraethylammonium blockade and C-type inactivation. *The Journal of Physiology* **499**: 361-7
- Musset B, Meuth SG, Liu GX, Derst C, Wegner S, Pape HC, Budde T, Preisig-Müller R & Daut J (2006) Effects of divalent cations and spermine on the K<sup>+</sup> channel TASK-3 and on the outward current in thalamic neurons. *The Journal of Physiology* **572**: 639-57
- Nerbonne JM (2000) Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *The Journal of Physiology* **525**: 285-298
- Nguyen NA, Hanson C, Mather J, Gutman A, Karmilowicz J, Auperin D & George K (1994) Pharmacological Characterization of Five Cloned Voltage-Gated Expressed in Mammalian Cell Lines. *Molecular Pharmacology* **45**: 1227-34
- Nishikura K (2010) Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annual Review of Biochemistry* **79**: 321-49
- Okamoto Y, Tsuboi K & Ueda N (2009) Enzymatic formation of anandamide. *Vitamins and Hormones* **81**: 1-24
- Oliver D, Lien CC, Soom M, Baukowitz T, Jonas P & Fakler B (2004) Functional conversion between A-type and delayed rectifier K<sup>+</sup> channels by membrane lipids. *Science* **304**: 265-70
- Pellegrini-Giampietro DE, Bennett MV & Zukin RS (1992) Are Ca<sup>2+</sup>-permeable kainate/AMPA receptors more abundant in immature brain? *Neuroscience Letters* **144**: 65-9

- Peters CJ, Vaid M, Horne AJ, Fedida D & Accili EA (2009) The molecular basis for the actions of Kv $\beta$ 1.2 on the opening and closing of the Kv1.2 delayed rectifier channel. *Channels* **3**: 314-22
- De Petrocellis L, Bisogno T, Davis JB, Pertwee RG & Di Marzo V (2000) Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Letters* **483**: 52-6
- Pineda RH, Knoeckel CS, Taylor AD, Estrada-Bernal A & Ribera AB (2008) Kv1 potassium channel complexes in vivo require Kv $\beta$ 2 subunits in dorsal spinal neurons. *Journal of Neurophysiology* **100**: 2125-36
- Rajakulendran S, Schorge S, Kullmann DM & Hanna MG (2007) Episodic ataxia type 1: a neuronal potassium channelopathy. *Neurotherapeutics: the Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **4**: 258-66
- Rasmusson RL, Zhang Y, Campbell DL, Comer MB, Castellino RC, Liu S & Strauss HC (1995) Bi-stable block by 4-aminopyridine of a transient K<sup>+</sup> channel (Kv1.4) cloned from ferret ventricle and expressed in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Physiology* **6**: 59-71
- Ravens U & Wettwer E (2011) Ultra-rapid delayed rectifier channels: molecular basis and therapeutic implications. *Cardiovascular Research* **89**: 776-85
- Remillard CV & Leblanc N (1996) Mechanism of inhibition of delayed rectifier K<sup>+</sup> current by 4-aminopyridine in rabbit coronary myocytes. *The Journal of Physiology* **491.2**: 383-400
- Rhodes KJ, Strassle BW, Monaghan MM, Bekele-Arcuri Z, Matos MF & Trimmer JS (1997) Association and Colocalization of the Kv $\beta$ 1 and Kv $\beta$ 2-Subunits with Kv1  $\alpha$ -Subunits in Mammalian Brain K<sup>+</sup> Channel Complexes. *The Journal of Neuroscience* **17**: 8246-58
- Robertson B (1997) The real life of voltage-gated K<sup>+</sup> channels: more than model behaviour. *Trends in Pharmacological Sciences* **18**: 474-83
- Rueter SM, Dawson TR & Emeson RB (1999) Regulation of alternative splicing by RNA editing. *Nature* **399**: 75-80
- Sansom MSP, Shrivastava IH, Bright JN, Tate J, Capener CE & Biggin PC (2002) Potassium channels: structures, models, simulations. *Biochimica et Biophysica Acta* **1565**: 294-307
- Schmidt RF & Thews G (2007) Physiologie des Menschen Schmidt RF & Lang F (eds) *Springer*
- Seeds MC & Bass DA (1999) Regulation and Metabolism of Arachidonic Acid. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* **17**: 5-26
- Sewing S, Roeper J & Pongs O (1996) Kv $\beta$ 1 Subunit Binding Specific for *Shaker*-Related Potassium Channel  $\alpha$  Subunits. *Neuron* **16**: 455-63

- Shen NV & Pfaffinger PJ (1995) Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K<sup>+</sup> channel subunit proteins. *Neuron* **14**: 625-33
- Shi G, Nakahira K, Hammond S, Rhodes KJ, Schechter LE & Trimmer JS (1996)  $\beta$  subunits promote K<sup>+</sup> channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron* **16**: 843-52
- Shieh CC & Kirsch GE (1994) Mutational analysis of ion conduction and drug binding sites in the inner mouth of voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Biophysical Journal* **67**: 2316-25
- Snyders DJ, Tamkun MM & Bennett PB (1993) A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart. Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *The Journal of General Physiology* **101**: 513-43
- Snyders DJ (1999) Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovascular Research* **42**: 377-90
- Sokolowski B, Harvey M, Venkataramu C & Duzhy D (2005) Protein-protein interactions of a Kv $\beta$  subunit in the cochlea. *Journal of Neuroscience Research* **79**: 459-67
- Sommer B, Köhler M, Sprengel F & Seeburg PH (1991) RNA Editing in Brain Controls of Ion Flow in Glutamate-Gated Channels. *Cell* **67**: 11-9
- Song WJ (2002) Genes responsible for native depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in neurons. *Neuroscience Research* **42**: 7-14
- Spencer SS & Spencer DD (1994) Entorhinal-hippocampal interactions in medial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **35**: 721-7
- Streit AK (2008) Diplomarbeit: Funktionelle Untersuchungen zur Regulation der Inaktivierung und Pharmakologie von Kv1.x-Kanälen durch RNA-Editierung.
- Streit AK & Decher N (2011) A-to-I RNA Editing Modulates the Pharmacology of Neuronal Ion Channels and Receptors. *Biochemistry (Mosc.)* **76**: 890-9
- Streit AK, Derst C, Wegner S, Heinemann U, Zahn RK & Decher N (2011) RNA editing of Kv1.1 channels may account for reduced ictogenic potential of 4-aminopyridine in chronic epileptic rats. *Epilepsia* **52**: 645-8
- Sukhareva M, Hackos DH & Swartz KJ (2003) Constitutive activation of the *Shaker* Kv channel. *The Journal of General Physiology* **122**: 541-56
- Tobias LD & Hamilton JG (1979) The effect of 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid on lipid metabolism. *Lipids* **14**: 181-93
- Uebele VN, England SK, Gallagher DJ, Snyders DJ, Bennett PB & Tamkun MM (1998) Distinct domains of the voltage-gated K<sup>+</sup> channel Kv $\beta$ 1.3  $\beta$ -subunit affect voltage-dependent gating. *Am J Physiol Cell Physiol* **274**: 1485-95

- Utsunomiya I, Tanabe S, Terashi T, Ikeno S, Miyatake T, Hoshi K & Taguchi K (2010) Identification of amino acids in the pore region of Kv1.2 potassium channel that regulate its glycosylation and cell surface expression. *Journal of Neurochemistry* **112**: 913-23
- Wagner RW, Yoo C, Wrabetz L, Kamholz J, Buchhalter J, Hassan NF, Khalili K, Kim SU, Perussia B & McMorris FA (1990) Double-stranded RNA unwinding and modifying activity is detected ubiquitously in primary tissues and cell lines. *Molecular and Cellular Biology* **10**: 5586-90
- Van Wagoner DR & Nerbonne JM (2000) Molecular basis of electrical remodeling in atrial fibrillation. *The Journal of Molecular Cell Cardiology* **32**: 1101-17
- Wang H, Kunkel DD, Schwartzkroin PA & Tempel BL (1994) Localization of Kv1.1 and Kv1.2, two K channel proteins, to synaptic terminals, somata, and dendrites in the mouse brain. *Journal of Neuroscience* **14**: 4588-99
- Wang Q, Miyakoda M, Yang W, Khillan J, Stachura DL, Weiss MJ & Nishikura K (2004) Stress-induced apoptosis associated with null mutation of *ADAR1* RNA editing deaminase gene. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 4952-61
- Wang W (2004) Renal potassium channels: recent developments. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **13**: 549-55
- Wang Z, Kiehn J, Yang Q, Brown AM & Wible BA (1996) Comparison of binding and block produced by alternatively spliced Kv $\beta$ 1 subunits. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 28311-7
- Woodcock EA, Kistler PM & Ju YK (2009) Phosphoinositide signalling and cardiac arrhythmias. *Cardiovascular Research* **82**: 286-95
- Wulff H & Zhorov BS (2008) K<sup>+</sup> channel modulators for the treatment of neurological disorders and autoimmune diseases. *Chemical Reviews* **108**: 1744-73
- Yao J & Tseng G (1994) Modulation of 4-AP Block of a Mammalian A-Type K<sup>+</sup> Channel Clone by Channel Gating and Membrane Voltage Electrophysiological experiments. *Biophysical Journal* **67**: 130-42
- Yellen G (1998) The moving parts of voltage-gated ion channels. *Quarterly Reviews of Biophysics* **31**: 239-95
- Yi BA, Minor DL, Lin YF, Jan YN & Jan LY (2001) Controlling potassium channel activities: Interplay between the membrane and intracellular factors. *PNAS* **98**: 11016-23
- Zahn RK, Tolner EA, Derst C, Gruber C, Veh RW & Heinemann U (2008) Reduced ictogenic potential of 4-aminopyridine in the perirhinal and entorhinal cortex of kainate-treated chronic epileptic rats. *Neurobiology of Disease* **29**: 186-200
- Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S & MacKinnon R (2001b) Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* **411**: 657-61

- Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A & MacKinnon R (2001a) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* **414**: 43-8
- Zhu J, Gomez B, Watanabe I & Thornhill WB (2005) Amino acids in the pore region of Kv1 potassium channels dictate cell-surface protein levels: a possible trafficking code in the Kv1 subfamily. *The Biochemical Journal* **388**: 355-62
- Zhu J, Watanabe I, Poholek A, Koss M, Gomez B, Yan C, Recio-Pinto E & Thornhill WB (2003) Allowed N-glycosylation sites on the Kv1.2 potassium channel S1-S2 linker: implications for linker secondary structure and the glycosylation effect on channel function. *The Biochemical Journal* **375**: 769-75
- Zuzarte M, Rinné S, Schlichthörl G, Schubert A, Daut J & Preisig-Müller R (2007) A di-acidic sequence motif enhances the surface expression of the potassium channel TASK-3. *Traffic* **8**: 1093-100

## 6. ANHÄNGE

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
4-AP	4-Aminopyridin
5-HT <sub>2C</sub> -Rezeptor	5-Hydroxytyrosin-Rezeptor vom Typ 2C
AA	Arachidonsäure (engl.: „arachidonic acid“)
ADAR	Engl.: „adenosine deaminase acting on RNA“
AEA	Arachidonyl-Ethanolamin (Anandamide)
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA-R.	Engl.: „alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA)-sensitive receptor“
APD	Aktionspotentialdauer (engl.: „action potential duration“)
cRNA	Engl.: „complementary RNA“
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: „deoxyribonucleic acid“)
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DHA	Docosahexaensäure (engl.: „docosahexaenoic acid“)
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EGFP	Verbessertes Grün Fluoreszierendes Protein (engl.: „enhanced green fluorescent protein“)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol

ETYA	Eicosatetraensäure (engl.: „eicosatetraynoic acid“)
GluR-B	Glutamat Rezeptor Untereinheit B
h	Stunden (lat.: „hora“)
HA	Hämagglutinin
IC <sub>50</sub>	Konzentration zur 50 %-igen Inhibition
JSTX	Joro-Spinnentoxin
Kv-Kanal	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal
LB-Medium	Lysogeny Broth-Medium
min	Minuten
mRNA	Engl.: „messenger RNA“
MS	Multiple Sklerose
NTP	Nukleotid Triphosphat
p.a.	Hoher Reinheitsgrad, zu Analysezwecken geeignet (engl.: „pro analysis“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: „polymerase chain reaction“)
PIPs	Phosphatidylinositolphosphate
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: „ribonucleic acid“)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: „rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur (20 - 22 °C)
S1-S6	Transmembranhelices
sn	Stereospezifische Nummerierung

t-Butyl-HO <sub>2</sub>	tert-Butyl Hydroperoxid
TEA	Tetraethylammonium
TEVC	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (engl.: „two electrode voltage clamp“)
TLE	Temporallappenepilepsie
tRNA	Transfer-RNA
ü.N.	Über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen (Volumenprozent)
w/v	Gewicht/Volumen (Gewichtsprozent) (engl.: „weight/volume“)
WT	Wildtyp

Nicht aufgeführt sind:

- Die Formelzeichen des Internationalen Einheitensystems (SI, Le Système international d'unités) und deren abgeleitete Einheiten.
- Die Abkürzungen für chemische Elemente. Sie entsprechen den Angaben des Periodensystems der Elemente nach der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).
- Allgemein gebräuchliche Abkürzungen der deutschen Sprache nach dem Duden.

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
Abb. 1.1	Struktur und Funktion von Kv-Kanälen	6
Abb. 1.2	Strukturelle Grundlagen der A-Typ Inaktivierung	9
Abb. 1.3	N-terminale Aminosäuresequenzen der drei Spleißvarianten von Kv $\beta$ 1	10
Abb. 1.4	Schema eines RNA Editierungskomplexes	15
Abb. 1.5	Die RNA Editierung der GluR-B-Untereinheit des AMPA-Rezeptors beeinflusst dessen Pharmakologie	18
Abb. 1.6	Der Serotonin-Rezeptor 5-HT <sub>2C</sub> besitzt mehrere RNA Editierungsstellen	19
Abb. 1.7	RNA Editierung des Kv1.1-Kanals	20
Abb. 1.8	Editierte Kv1.1-Kanäle zeigen eine reduzierte Stromgröße in <i>Xenopus</i> Oozyten	20
Abb. 2.1	Prinzip der Software gestützten Analyse von Western Blot Ergebnissen	30
Abb. 2.2	Funktionsprinzip der Hämagglutinin-Epitop basierten Oberflächenexpressionsanalyse	31
Abb. 3.1	Inhibition von Kv1.1-Kanälen durch endogene Fettsäuren	40
Abb. 3.2	Arachidonsäure blockiert Kv1.1-Kanäle in der zentralen Pore	42
Abb. 3.3	Arachidonsäure konkurriert mit TEA um die Bindung in der Pore	44
Abb. 3.4	Die Kanalblockade durch rHongotoxin wird durch die Kv1.1 Editierung nicht beeinflusst	45
Abb. 3.5	Molecular Docking Experimente bestätigen die Blockade der zentralen Kanalpore durch Lipide	46

<b>Abbildung</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
Abb. 3.6	Editierete Kv1.1-Untereinheiten beeinflussen die Pharmakologie der Kv1-Kanalfamilie	47
Abb. 3.7	Reduziertes iktogenes Potential von 4-AP und erhöhte Kv1.1-Editierungslevel bei chronisch epileptischen Ratten des Kainat-induzierten Modells	48
Abb. 3.8	Erhöhte Kv1.1 Editierungslevel reduzieren die 4-AP Affinität	49
Abb. 3.9	Spannungsabhängigkeit, Aktivierungskurven und Blockkinetik werden durch das erhöhte Editierungslevel nicht verändert	51
Abb. 3.10	Vergleich der Ganzzellströme nicht editierter und editierter EGFP-markierter Kv1.1-Kanäle in HeLa-Zellen	53
Abb. 3.11	Einzelkanalanalyse nicht editierter und editierter Kv1.1-Kanäle in HEK293-Zellen	55
Abb. 3.12	Expressionsanalyse der nicht editierten und editierten Kv1.1-Kanäle in <i>Xenopus</i> Oozyten	57
Abb. 3.13	Zelluläre Lokalisation der nicht editierten und editierten Kv1.1-Untereinheiten in HeLa-Zellen	59
Abb. 3.14	Lokalisation der Inaktivierungsdomäne von Kv $\beta$ 1.3-Untereinheiten	61
Abb. 3.15	Phosphoinositide regulieren das Ausmaß der Inaktivierung durch Interaktion mit einem Arginirest der Kv $\beta$ 1.3-Untereinheiten	63
Abb. 3.16	Oxidation antagonisiert die Inaktivierung durch Kv $\beta$ 1.3-R5C	64
Abb. 3.17	Die oxidative Modifizierung der Inaktivierung ist vom Aktivierungs- bzw. Inaktivierungszustand des Kanals abhängig	65
Abb. 3.18	Strukturmodell des Kv $\beta$ 1.3-Inaktivierungspartikels in der Pore des Kv1.5-Kanals	67
Abb. 4.1	Vergleich der Aminosäuresequenzen der Porenschleifen innerhalb der Kv1-Kanalfamilie	72
Abb. 4.2	Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen humaner Kv $\beta$ 1-Untereinheiten und Kv-Kanäle mit A-Typ Inaktivierung	78

## 6.3 Eigene Publikationen

### **Folgende Veröffentlichungen enthalten Teile der in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse:**

Decher N, Gonzalez T, **Streit AK**, Sachse FB, Renigunta V, Soom M, Heinemann SH, Daut J & Sanguinetti MC (2008) Structural determinants of Kv $\beta$ 1.3-induced channel inactivation: a hairpin modulated by PIP<sub>2</sub>. *The EMBO Journal* **27**: 3164-74

Decher N\*, **Streit AK\***, Rapedius M, Netter MF, Marzian S, Ehling P, Schlichthörl G, Craan T, Renigunta V, Köhler A, Dodel RC, Navarro-Polanco R a, Preisig-Müller R, Klebe G, Budde T, Baukrowitz T & Daut J (2010) RNA editing modulates the binding of drugs and highly unsaturated fatty acids to the open pore of Kv potassium channels. *The EMBO Journal* **29**: 2101-13

*\* Diese Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen*

**Streit AK**, Derst C, Wegner S, Heinemann U, Zahn RK & Decher N (2011) RNA editing of Kv1.1 channels may account for reduced ictogenic potential of 4-aminopyridine in chronic epileptic rats. *Epilepsia* **52**: 645-8

**Streit AK** & Decher N (2011) A-to-I RNA Editing Modulates the Pharmacology of Neuronal Ion Channels and Receptors. *Biochemistry (Mosc.)* **76**: 890-9  
(eingeladener Review – Übersichtsartikel)

### **Weitere eigene Veröffentlichungen:**

**Streit AK\***, Netter MF\*, Kempf F\*, Walecki M, Rinné S, Bollepalli MK, Preisig-Müller R, Renigunta V, Daut J, Baukrowitz T, Sansom M, Stansfeld PJ & Decher N (2011) A specific two-pore-domain potassium channel blocker defines the structure of the TASK-1 open pore. *The Journal of Biological Chemistry* **16**: 13977-84

*\* Diese Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen*

## 6.4 Liste der akademischen Lehrer

Philipps-Universität Marburg:

Agarwal, Bastians, Bauer, Bette, Boekhoff, Breit, Bremmer, Bröring, Büch, Burchert, Cetin, Daut, Decher, Del Rey, Dietrich, Elsässer, Feuser, Garten, Gudermann, Grzeschik, Hasilik, Hassel, Hinz, Hofmann, Huber, Jakob, Jungclas, Kirchner, Koolmann, Krebber, Lang, Lill, Maisner, Mederos-y-Schnitzler, Moll, Müller, Petz, Plant, Röhm, Schäfer, Schulz, Schütz, Schwarz, Seitz, Suske, Voigt, Weihe, Westermann

Vrije Universiteit Amsterdam:

Stiedl

## 6.5 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Niels Decher, der mir diese Promotion ermöglicht hat. Neben der ausgezeichneten Betreuung möchte ich ihm dafür danken, dass er mich stets gefördert, gefordert und motiviert hat und dabei der Spaß an der Forschung nicht auf der Strecke geblieben ist.

Ein großer Dank gilt zudem unseren Kollaborationspartnern...

...aus der Gruppe von Prof. Dr. Baukrowitz in Kiel für die Messungen in der Inside-out Makropatch Konfiguration.

...aus der Gruppe von Prof. Dr. Heinemann in Berlin für die Bereitstellung der Proben aus dem Kainat-induzierten Epilepsiemodell und die Feldpotentialmessungen.

...aus der Gruppe von Prof. Dr. Klebe in Marburg und aus der Gruppe von Prof. Dr. Sachse in Salt Lake City, Utah (USA) für die Durchführung der Molecular Modelling Experimente.

Ich möchte mich ebenfalls bei meinen Kollegen aus der Physiologie in Marburg bedanken:

Dr. Günter Schlichthörl danke ich für seine geduldige Hilfe bei den Einzelkanalmessungen und der Auswertung dieser Messungen, Dr. Marylou Zuzarte für ihre kompetente Hilfe und die guten Ratschläge in der Zellkultur, Brigitte Burk für ihre technische Unterstützung und den Mitarbeitern der Werkstatt, die mit innovativen Ideen und viel Fingerspitzengefühl die kleinen Probleme des Laboralltags bekämpft haben.

Michael Netter danke ich für die Unterstützung bei der Fluoreszenzmikroskopie und für seine große Hilfsbereitschaft bei allen großen und kleinen EDV-Problemen. Konstantin Wemhöner möchte ich für seine kompetente Hilfe bei statistischen Fragestellungen danken.

Ein großer Dank gilt auch den guten Seelen der Molekularbiologie, Dr. Maren Limberg, Dr. Magdalena Walecki, Dr. Susanne Rinné sowie Oxana Nowak, Vanessa Huhn und Kirsten Ramlow, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Vielen lieben Dank den „Korrekturlesern“ dieser Arbeit: Dr. Maren Limberg, Julia Schiekel, Dr. Sven Wegner, Stefanie Marzian und Lina Matschke.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der AG Decher für das tolle Miteinander im Labor und den gemeinsamen Spaß, der das Arbeiten versüßt hat.

Last but not least möchte ich ganz herzlich meinen lieben Eltern, meinem Verlobten Sven und meinen Freunden danken, die mich stets sehr unterstützt haben.