

Universität Ulm
Institut für Angewandte Physiologie
Leiter Prof. Dr. B. Liss

**Untersuchung der σ -Pore in spannungsabhängigen
hKv-Kanälen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm
vorgelegt von Pavel Tyutyayev
aus Sankt-Petersburg

2017

Amtierender Dekan: Professor Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Stephan Grissmer
2. Berichterstatter: PD Dr. Karl Föhr

Tag der Promotion 29. Juni 2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
1 Einleitung	1
1.1 Ionenkanäle in Zellmembranen.....	1
1.2 Struktur spannungsgesteuerter Kaliumkanäle.....	2
1.3 Kanalzustände.....	3
1.4 Der Kaliumkanal <i>hKv1.2</i>	5
1.5 Der Kaliumkanal <i>hKv1.3</i>	6
1.6 Die α -Pore.....	6
1.7 Alternative Poren in verschiedenen Ionenkanälen.....	7
1.8 Zielsetzung der Arbeit.....	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Ortspezifische Mutagenese.....	11
2.2 Herstellung des trimeren <i>hKv1.3_V388C_EGFP</i> Kanals.....	12
2.3 Zellkultur.....	14
2.3.1 Medien und Kultivierung der Zellen.....	14
2.3.2 Transfektion der Zellen.....	14
2.3.3 Proteinextraktion aus kultivierten Zellen.....	16
2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	17
2.3.5 Subzelluläre Fraktionierung von Membranproteinen und Immunoaffinitätschromatographie.....	17
2.3.6 Dot Blot.....	19
2.4 Modellieren.....	19
2.5 Aufbau der Patch-Clamp-Apparatur.....	20
2.6 Durchführung von elektrophysiologischen Messungen.....	20
3 Ergebnisse	23
3.1 Elektrophysiologische Untersuchung der <i>hKv1.3_V388C</i> und <i>hKv1.2_V370C</i> Kanäle...23	
3.2 Die σ -Pore in tetrameren und in trimeren <i>hKv1.3_V388C</i> Kanälen.....	31

4 Diskussion	43
4.1 Der trimere <i>hKv1.3_V388C</i> Kanal.....	43
4.2 Modell der σ -Pore.....	44
4.3 Der σ -Strom – mögliche Ursache von Krankheiten.....	47
5 Zusammenfassung	49
6 Literaturverzeichnis	51
Danksagung	56
Lebenslauf	57

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
AgTX	Agiotoxin
BSA	Bovines Serumalbumin
CTX	Charybdotoxin
Con	Conotoxin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
mA	Milliampere
HBSS-Puffer	Hank's Balanced Salt Solution
HsTx1	Heteromerus spinifer Toxin
IC ₅₀	Die halbmaximale Blockade
kDa	Kilodalton
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
K _v	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal
KTX	Kaliotoxin
MgTX	Margatoxin
MTX	Maurotoxin
MW	molare Masse
pA	Picoampere
PBS	Phosphate-Buffered Solution
PBS/EDTA	Phosphate-Buffered Solution mit EDTA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (Detergenz)
Tab.	Tabelle
TEA	Tetraethylammoniumchlorid (Kanalblocker)
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht
vgl.	vergleiche

Teile dieser Arbeit sind bereits publiziert in:

Tyutyayev P, Grissmer S. (2017) Observation of σ -pore currents in mutant *hKv1.2_V370C* potassium channels. PLOS one;20:12(4):e0176078, doi:10.1371/journal.pone.0176078.

Der Artikel ist erschienen unter der Attribution 4.0 International (CC BY 4.0), <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

Tyutyayev P, Grissmer S. (2018) Characterization of the σ -pore in mutant *hKv1.3* potassium channels. Cell Physiol Biochem 2018;46:1112–1121, doi: 10.1159/000488840.

Der Artikel ist erschienen unter der Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0), <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>.

1 Einleitung

1.1 Ionenkanäle in Zellmembranen

Zellen sind von der Umgebung durch eine dünne Fettschicht (die Plasma- oder Zellmembran) abgegrenzt. Diese Plasmamembran grenzt das Innere der Zelle von dem Extrazellulärraum ab. Die Zellmembran ist für polare Moleküle wie Ionen undurchlässig. Für den Transport dieser Moleküle durch die Membran sind spezifische Membranproteine zuständig. Im einfachsten Falle sind diese Membranproteine sogenannte Ionenkanäle, die mit Hilfe einer Pore den Ionen ermöglichen, auf Grund ihres elektrochemischen Gradienten die Membran zu durchdringen. Manche Ionenkanäle sind hochselektiv und lassen nur ganz bestimmte Ionen durch, wie z. B. Kaliumionen. In diesem Fall spricht man von Kaliumkanälen. Eine weitere wichtige Eigenschaft von Kanälen ist, dass sie sich prinzipiell in zwei verschiedenen Zuständen befinden können, leitfähig oder nicht leitfähig. Das heißt, nur im leitfähigen Zustand lässt der Kanal Ionen durch, der Kanal ist „offen“. Im nicht leitfähigen Zustand können keine Ionen durch den Kanal, er ist entweder „geschlossen“ oder „inaktiviert“. Kanäle können auf verschiedene Art und Weise geöffnet werden, z. B. über die Bindung von Substanzen. In diesem Fall spricht man von liganden-gesteuerten Kanälen. Kanäle können auch direkt über mechanischen Zug oder Druck auf die Zellmembran geöffnet werden. Eine weitere Möglichkeit, Ionenkanäle zu öffnen, besteht in der Veränderung des Membranpotentials der Zelle. In diesem Fall spricht man von potential- oder spannungsgesteuerten Kanälen.

Spannungsgesteuerte Ionenkanäle kommen in vielen Zellen unseres Körpers vor und sind unter anderem verantwortlich für die Funktion von Nerven- und Muskelzellen. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Herzaktion. Eine Fehlfunktion von z. B. spannungsgesteuerten Kaliumkanälen kann deshalb zu Krankheiten führen wie z. B. Muskellähmungen oder Arrhythmien im Herz. Da meine Dissertation von genau diesen spannungsgesteuerten Kaliumkanälen handelt, werde ich in den folgenden Kapiteln die wesentlichen Eigenschaften dieser Kanäle beschreiben.

1.2 Struktur spannungsgesteuerter Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind spezifische, hochkomplexe Membranproteine, die für Kaliumionen selektiv permeabel sind. Es existieren spannungsaktivierte und nicht spannungsaktivierte Kaliumkanäle. Zurzeit sind mehr als 70 Gene der Kaliumkanäle im Säugetiergenom bekannt (Goldin et al., 2000). Die spannungsgesteuerten Kv-Kanäle bilden wiederum die größte Familie von etwa 40 Genen aus der Gruppe der menschlichen Kaliumkanäle (Catterall et al., 2002).

Kaliumkanäle sind große Membranproteine, die in der Regel aus vier identischen oder verschiedenen α -Untereinheiten (Teilen) bestehen (Hille, 2001). Wenn alle α -Untereinheiten gleich sind, nennt man das Homotetramer, wenn nur eine aus vier verschieden ist, bezeichnet man das als Heterotetramer. Eine α -Untereinheit besteht aus ca. 500 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von ca. 250 kDa. Die Untereinheit selbst besteht aus sechs Transmembransegmenten (S1-S6) und dem Porenbereich zwischen S5 und S6 (siehe Abb. 1) (Hille, 2001). Die Segmente S1, S2, S3 und S4 stellen die Spannungssensordomäne dar und S4 ist der eigentliche Spannungssensor. Der Sensor S4 hat mehrere positiv geladene Aminosäuren (Arginin) an jeder dritten Position. Diese geladenen Aminosäuren sind von Bedeutung für die Aktivierung (Öffnung) der Kanäle, da diese Aminosäuren eine Veränderung des Membranpotentials wahrnehmen können. Der Spannungssensor ist mit dem Linker aus S4-S5 mit dem Porenbereich verbunden. Die Pore wird durch die Segmente 5 bis 6 gebildet (Catterall, 2000). Dieser S5-P-S6-Bereich bildet im funktionellen Kanal die zentrale α -Pore, die selektiv für K^+ permeabel ist. Wie diese Strukturen beim Öffnen, Schließen und der Selektivität des Kanals beteiligt sind, werde ich in den kommenden Kapiteln beschreiben.

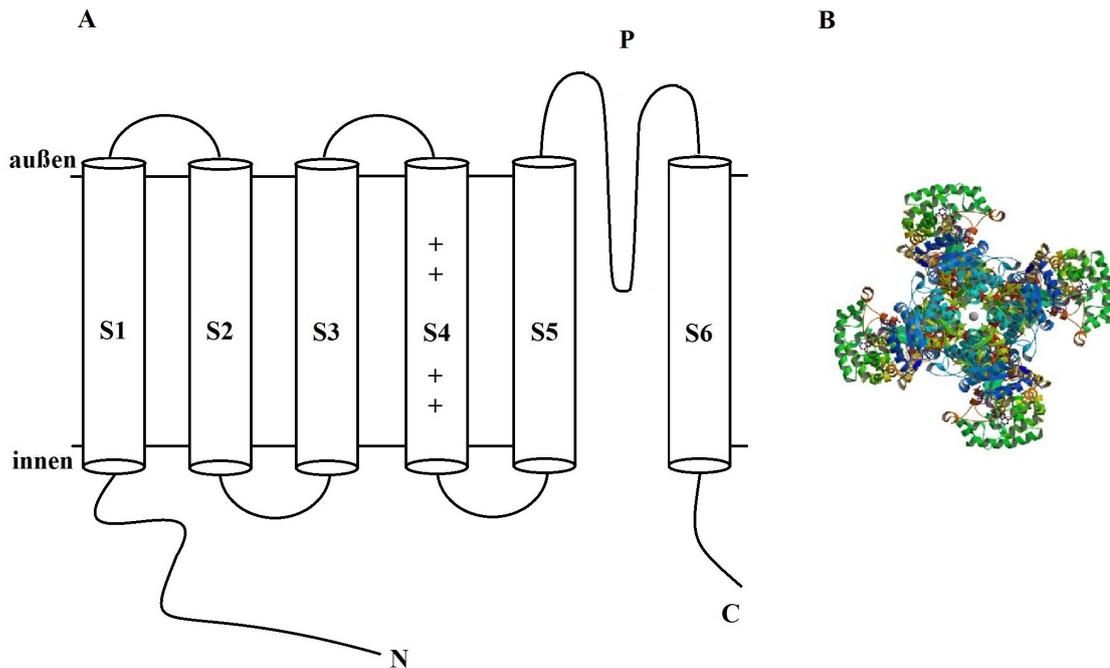


Abb. 1. Die Architektur von Kv-Kaliumkanälen. A, die Untereinheiten bestehen aus sechs Transmembransegmenten und einer Porenregion (P). Die C- und der N-Termini liegen auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran. Das vierte Transmembransegment (S4) ist der Spannungssensor. B, das Modell des Kv1.2-Kanals (nach dem pdb Swisshot 2A79). Das Modell des Homotetramers wurde mit Hilfe des Programms Yasara visualisiert (<http://yasara.org>).

1.3 Kanalzustände

Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle verändern ihren Zustand auf Grund von Änderungen des Zellmembranpotentials. Der Kanal kann, wie in der Einleitung erwähnt, prinzipiell in zwei funktionell verschiedenen Zuständen vorkommen, leitfähig oder nicht leitfähig. Kann der Kanal Ionen durchlassen, ist er leitfähig oder offen, kann er keine Ionen durchlassen, ist er entweder geschlossen oder inaktiviert. Der Übergang vom geschlossenen in den offenen Zustand heißt Aktivierung, der umgekehrte Vorgang heißt Deaktivierung.

Bei negativen Membranpotentialen, dem sogenannten Ruhepotential, befinden sich die Kanäle in einem nicht-leitenden, geschlossenen Zustand. In diesem geschlossenen Zustand können die Kaliumionen nicht durch die Pore durchgehen. Wird die Membran depolarisiert (das Membranpotential wird positiver als das Ruhemembranpotential), geht der Kanal in den leitenden, offenen Zustand über (Aktivierung) und die K^+ können durch die Pore

durchtreten. Wird das Membranpotential jetzt wieder repolarisiert (das Membranpotential kehrt zum Ruhemembranpotential zurück) oder sogar hyperpolarisiert auf Membranpotentialwerte negativer als das Ruhemembranpotential, kehren die Kanäle vom offenen Zustand wieder zum geschlossenen Zustand zurück (Deaktivierung).

Für diese membranpotential- oder spannungsabhängigen Übergänge vom geschlossenen zum offenen Kanal ist das Zusammenspiel verschiedener Teile des Kanals verantwortlich. Im geschlossenen Zustand stellt die Anordnung der S6-Segmente der vier Untereinheiten ein Hindernis für den Durchtritt von K^+ dar. Wird das Membranpotential depolarisiert, dann bewegt sich zunächst einmal der Spannungssensor S4 in Richtung der extrazellulären Seite, und zwar mit einer gleichzeitigen Rotation (Starace und Benzanilla, 2004). Wenn alle S4-Segmente der vier Untereinheiten diese Bewegung durchgeführt haben, folgt eine weitere gemeinsame Bewegung in S5 und S6, da die Spannungssensoren über die S4-S5-Linker mit S5 verbunden sind (Soler-Llavinia et al., 2006; Pathak et al., 2007). Durch diese Bewegung wird die Bündelung der S6-Segmente gespreizt, sodass jetzt K^+ durch den Kanal durch die zentrale α -Pore fließen können. Inaktivierung: Wie oben beschrieben, kann der Kanal vom offenen Zustand in den geschlossenen Zustand übergehen, wenn das Membranpotential hyperpolarisiert wird. Es gibt aber noch einen zusätzlichen nicht-leitenden Zustand des Kanals, speziell bei lange anhaltenden Depolarisationen. Da bei diesen Potentialen S4 immer noch zur extrazellulären Seite neigt und damit auch die oben beschriebene Spreizung der S6-Bündelung so steht, dass eigentlich K^+ durch den Kanal fließen sollten, muss ein anderer Teil des Kanalmoleküls dafür verantwortlich sein, dass keine K^+ mehr durch den Kanal fließen. Bei der N-Typ-Inaktivierung (Armstrong und Bezanilla, 1977) blockiert der N-Terminus einer Untereinheit die α -Pore von der Innenseite der Membran, nachdem die Spreizung der S6-Bündel einen Rezeptor für den N-Terminus freigelegt hat („ball chain model“, Armstrong und Bezanilla, 1977).

Die strukturellen Veränderungen bei der C-Typ-Inaktivierung beruhen wahrscheinlich auf einer Veränderung des Selektivitätsfilters (Kiss et al., 1999). Die C-Typ-Inaktivierung ist nur bei fehlender N-Typ-Inaktivierung detektierbar. Dieser Typ der Inaktivierung erfolgt wesentlich langsamer als die N-Typ-Inaktivierung und kann durch extrazellulär applizierte Kanalblocker beeinflusst werden (Grissmer und Cahalan, 1989). Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass dieser Mechanismus vor allem durch relativ geringe Veränderungen

der Struktur des Selektivitätsfilters verursacht wird (Yellen, 1998). Der Kv1.2-Kanal hat im Vergleich zum Kv1.3-Kanal eine langsame C-Typ-Inaktivierung. Über die Funktion und Expression des Kv1.2-Kanals schreibe ich im nächsten Abschnitt.

1.4 Der Kaliumkanal Kv1.2

Kv1.2 ist sowohl im peripheren Nervensystem, in paranodalen und juxtanodalen Zonen von myelinisierten Nervenfasern als auch im Zentralnervensystem im Cortex exprimiert (Robbins und Tempel, 2012). Darüber hinaus sind Kv1.2-Kanäle auch im kardiovaskulären System exprimiert (Rasband und Trimmer, 2001). Zusammen mit den Untereinheiten von Kv1.1- und Kv1.6-Kanälen bilden die Kv1.2-Kanäle heteromere Kaliumkanäle im Gehirn, die für die neuronale Signaltransduktion eine große Rolle spielen (Dodson et al., 2002). Die Kv1.2-haltigen Kanäle verhindern eine präsynaptische Übererregbarkeit und damit abnormale Aktivität in Neuronen. Verschiedene Substanzen können Kv1.2-Kanäle blockieren und auf diese Weise verschiedene physiologische Prozesse beeinflussen.

Durch verschiedene Reagenzien kann man die Kanäle blockieren und damit den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion des Kanals erforschen. Der Kv1.2-Kanal ist z. B. durch 4-Aminopyridin (4-AP), Dendrotoxin (DTX), Charybdotoxin (CTX) und Conotoxin (CON) inhibiert, wohingegen Tetraethylammonium (TEA), ein klassischer Kaliumkanalblocker, doch fast keine Wirkung auf Kv1.2-Kanäle hat (Werkman et al., 1993). TEA kann an den Kv1.2-Kanal, verglichen mit anderen Kaliumkanälen, kaum an die extrazelluläre Seite der Pore binden und nur bei sehr hohen TEA-Konzentrationen ($K_D \sim 560$ mM) den Strom durch den Kanal reduzieren. Unter K_D versteht man die Gleichgewichtdissoziationskonstante einer reversiblen Reaktion, die angibt, bei welcher Wirkstoffkonzentration das Verhältnis von gebundenem und freiem Wirkstoff 1 ist.

Die Peptidtoxine wie z.B. CTX, MTX (Maurotoxin) und KTX (Kaliotoxin) können gut den Kv1.2-Kanal blockieren. Die Toxine unterscheiden sich in der Affinität zu dem Kv1.2-Kanal und sie ist von der Struktur der Bindestelle im Kanal abhängig, z. B. blockiert Margatoxin (MgTX) die Kv1.2-Kanäle mit einem K_D -Wert von 520 pM und der K_D -Wert für Charybdotoxin (CTX) beträgt für diese Kanäle 14 nM. Das HsTx1-Toxin (α -Ktx 6.3) kann den Kv1.2-Kanal nicht blockieren. Die Bindungsstelle für alle diese Toxine liegt auf der

extrazellulären Seite der Pore. Die Struktur des Kv1.2- und Kv1.3-Kanals ist sehr ähnlich. Über den Kv1.3-Kanal werde ich im nächsten Kapitel berichten.

1.5 Der Kaliumkanal Kv1.3

Der Kv1.3-Kanal ist in verschiedenen Geweben des Menschen und anderen Säugetieren zu finden, z. B. in der Retina, den Adipozyten, Lymphozyten, Neuronen, der Niere und dem Gehirn (Kaufmann et al., 2013). Der Kanal spielt eine Rolle in der Apoptose und kann die Zellmigration regulieren. Der Kanal kann bei der Entstehung von Krankheiten involviert sein, z. B. bei der autoimmunen Pankreatitis oder beim Adenokarzinom (Cannon, 1997).

Den Kaliumkanal Kv1.3 kann man durch zahlreiche niedermolekulare Modulatoren wie Alkaloide, Piperidine und Psoralene blockieren (Vennekamp et al., 2004). Zu den Inhibitoren des Kanals gehören auch Toxine, z. B. CTX, MgTX, Agiotoxin (AgTx) und andere Peptide (Garcia-Calvo et al., 1993, Grissmer et al., 1994). Die Peptidtoxine binden an den extrazellulären Eingang des Kanals und können so wirksam und spezifisch den Strom durch die α -Pore blockieren. Die effektiven Konzentrationen für die halbmaximale Blockade des Kv1.3-Stroms (IC_{50}) liegen im picomolaren Bereich, z. B. hat Margatoxin einen K_D -Wert von 110 pM für den Kv1.3-Kanal. Die Affinität einiger Substanzen zum *hKv1.3* und *hKv1.2* kann sich unterscheiden. Der Grund dafür ist der Unterschied im Porenbereich beider Kanäle. TEA blockiert den Kv1.3-Kanal mit einem K_D -Wert von 10 mM verglichen mit dem K_D -Wert von 560 mM für den Kv1.2. Im *hKv1.2* ist an der TEA-Bindungsstelle (Position 381) ein Valin zu finden und im *hKv1.3* ist an dieser homologen Position 399 ein Histidin vorhanden. Ähnlich können sich Peptidtoxine unterscheiden: Z. B. hat Maurotoxin (MTX) einen K_D -Wert von 0,7 nM am *hKv1.2*- und einen K_D -Wert von 3,3 μ M am *hKv1.3*-Kanal, d. h., MTX hat eine mehr als 1000-fach schlechtere Affinität zum *hKv1.3*-Kanal verglichen mit dem *hKv1.2*-Kanal. Deshalb hängt die Affinität des Toxins nicht nur von der α -Pore, sondern auch von naheliegenden Bereichen des Kanals ab. Über die α -Pore werde ich im nächsten Abschnitt berichten.

1.6 Die α -Pore

Im offenen Zustand sind Kaliumkanäle selektiv und sind für K^+ durchlässig. Die K^+ gehen durch die zentrale α -Pore. Diese Selektivität wird durch den Selektivitätsfilter gewährleistet.

Der Filter enthält ein GYG-Sequenzmotiv. Den eigentlichen Filter bilden die negativ geladenen Carbonyl-Sauerstoffatome der Aminosäuren und er ist an der engsten Stelle der Pore platziert. Durch seine negative Ladung ist der Filter nicht für Anionen durchlässig (Hille, 2001). Durch Wechselwirkungen am Filter werden die K^+ beim Eintritt in die Pore von ihrer Hydrationshülle befreit.

Es gibt immer mehr Hinweise, dass durch Kanäle, mittels Mutationen, neue Durchgangswege für Ionen geöffnet werden können. Diese Wege lassen sich als alternative Poren bezeichnen. Diese Poren wurden hauptsächlich in Nav- und Kv-Kanälen beobachtet. Im folgenden Kapitel werde ich Beispiele von alternativen Poren beschreiben.

1.7 Alternative Poren in verschiedenen Kanälen

ω -Pore im R1C-mutierten *Shaker*-Kanal

Mutationen in der Spannungssensordomäne (VSD, voltage-sensing-domaine) des *hNav1.2* oder im spannungsgesteuerten *Shaker*-Kaliumkanal führten zur Bildung eines weiteren Ionenpermeationswegs durch das Kanalmolekül (Sokolov et al., 2005, 2007, Tombola et al., 2005, 2006, 2007). Dieser neue Weg durch die VSD wurde als ω -Pore bezeichnet. Der Strom durch die ω -Pore war selektiv für monovalente Kationen und die ω -Pore war bei Potentialen offen, bei denen die α -Pore geschlossen war (Tombola et al., 2006). Viele Studien zeigten auch, dass Mutationen in der VSD die Selektivität des ω -Stroms in Kaliumkanälen beeinflussen konnten, denn der ω -Strom konnte entweder von Protonen oder Kationen getragen werden (Struyk und Cannon, 2007). Alle diese Mutationen waren in den Transmembran-S4-Segmenten lokalisiert und neutralisierten positive Ladungen, die für die Spannungsempfindlichkeit wichtig sind (Matthews et al., 2009).

Speziell im *Shaker*-Kanal öffnete sich eine alternative ω -Pore durch den Austausch des positiv geladenen Arginins an Position 362 in S4 gegen Cystein oder Serin, wenn der Strom durch die zentrale α -Pore normal war (Tombola et al., 2006). Der Strom durch die ω -Pore war nur bei hyperpolarisierenden Potentialen negativer als -100 mV zu beobachten. Im Gegensatz zur zentralen α -Pore war die ω -Pore auch für andere monovalente Kationen permeabel. Wurde das Arginin an Position 362 in S4 durch Histidin ersetzt, dann konnte die so entstandene ω -Pore nur Protonen leiten. Mit Hilfe eines 3D-Modells der Kristallstruktur von KvAP wurde ein Modell für die ω -Pore vorgeschlagen (Tombola et al., 2005). Die ω -

Pore entsteht in der Lücke zwischen den Transmembransegmenten S2 und S4. Diese Lücke entsteht durch den Austausch von Arginin gegen das kleinere Cystein. Bei der Hyperpolarisation bleibt der Spannungssensor S4 in seiner Ruheposition und das lässt die ω -Pore offen. Bei Depolarisation bewegt sich der Spannungssensor S4 in Richtung der extrazellulären Seite und die ω -Pore wird verschlossen. Damit ist die Permeabilität der ω -Pore abhängig von der Lage des Spannungssensors.

σ -Pore in Kv1.3

Ein weiterer Durchgang für Ionen (σ -Pore) durch einen mutierten Kaliumkanal wurde von Prüting und Kollegen (2011) beschrieben, und zwar in einer Valin-zu-Cystein-Mutation an Position 388 in *hKv1.3* (*Shaker*-Position 438). Dieser mutierte *hKv1.3_V388C*-Kanal zeigte zusätzlich zu dem Strom durch die α -Pore einen Einwärtsstrom bei Membranpotentialen negativer als -100 mV. Dieser σ -Strom zeigte Ähnlichkeiten mit dem ω -Strom, der durch die VSD des oben beschriebenen R1C/S-mutierten *Shaker*-Kanals fließt. Die ω - und σ -Ströme konnten nur bei Potentialen negativer als -100 mV beobachtet werden, wenn die zentrale α -Pore normalerweise geschlossen ist. Die beiden Ströme konnten durch verschiedene monovalente Kationen wie Li^+ und Cs^+ getragen werden und die extrazellulär applizierten α -Pore-blockierenden Substanzen reduzierten den Strom durch die α -Pore, hatten jedoch keinen Einfluss auf den ω - oder σ -Strom.

Da der ω -Strom am besten durch K^+ und der σ -Strom am besten durch Na^+ getragen werden konnte, wurde geschlossen, dass der Verlauf des ω -Stroms und des σ -Stroms verschieden war. Außerdem zeigte der *hKv1.3_V388C*-mutierte Kanal nicht nur einen dauerhaften Einwärtsstrom bei Potentialen negativer als -100 mV in einer extrazellulären Lösung mit $[\text{160 Na}^+ + \text{4,5 K}^+]_o$, sondern zeigte in einer extrazellulären Lösung mit $[\text{164,5 K}^+]_o$ ein normales Stromverhalten wie in *hKv1.3_wt*-Kanälen. Dieses normale Stromverhalten des *hKv1.3_V388C*-Mutantenkanals in $[\text{164,5 K}^+]_o$ ließ den Schluss zu, dass die V388C-Mutation im *hKv1.3_wt*-Kanal einen Kanal mit zwei Wegen für Ionen durch den Kanal erzeugte. Einen Weg bildete die zentrale α -Pore, die den K^+ -Durchtritt in Gegenwart von extrazellulärem K^+ erlaubt, und einen anderen Weg bildete die σ -Pore, die funktionell ähnlich, aber physisch verschieden vom ω -Weg ist. Die σ -Pore entsteht im mutierten *hKv1.3_V388C*-Kanal durch den Austausch des Valins durch Cystein und durch eine damit

einhergehende Entfernung der beiden Methylgruppen des Valins an Position 388. Diese Entfernung vergrößert den Raum zwischen Y395 und W384 im Kanal und ermöglicht jetzt den Durchgang von Ionen. Die σ -Pore befindet sich hinter der zentralen α -Pore an der Rückseite des Selektivitätsfilters und verläuft parallel zur zentralen α -Pore. Der Eintritt der σ -Pore liegt zwischen dem Tyr-395 des GYG-Motivs und dem Trp-384 der Porenhelix.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Der σ -Strom in mutierten *hKv1.3_V388C*-Kanälen wurde von Prütting et al. (2011) beschrieben. In ihrem Modell entfernte der Austausch der Aminosäure Valin durch Cystein zwei Methylgruppen in der Seitenkette des Valins an Position 388 und vergrößerte dadurch den Raum zwischen Tyrosin 395 und Tryptophan 384 so weit, dass jetzt Ionen durchgehen können. Die σ -Pore verläuft parallel zur zentralen α -Pore auf der Rückseite des Selektivitätsfilters. Der Eingang zur σ -Pore lag zwischen Tyrosin 395 des GYG-Motivs des Selektivitätsfilters und dem Tryptophan 384 des Porenbereichs (Prütting et al., 2011).

In dieser Arbeit sollen drei Themengebiete bearbeitet werden. Erstens soll geklärt werden, ob die σ -Pore spezifisch für den *hKv1.3* ist oder ob die σ -Pore auch in anderen Kaliumkanälen beobachtet werden kann. Dies könnte darauf hindeuten, dass die σ -Pore ein gemeinsames strukturelles Element einer Vielzahl von spannungsabhängigen Ionenkanälen ist. Dazu werde ich versuchen, eine σ -Pore in einem sehr nah verwandten Kaliumkanal, dem *hKv1.2_wt*, zu kreieren, indem ich an der homologen Position 370 auch das Valin durch ein Cystein ersetze. Zweitens soll ein Kanaltrimer hergestellt und getestet werden, ob dieser Trimer eine σ -Pore bilden kann. Drittens soll der vorgeschlagene Verlauf der σ -Pore genauer charakterisiert werden. Dazu sollen verschiedene Mutationen im Hintergrund des *hKv1.3_V388C*-mutierten Kanals untersucht werden. Diese Mutationen werden an Positionen sein, von denen ich vermute, dass sie Teil der σ -Pore sind.

Speziell sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Kann ein σ -Strom durch den *hKv1.2_V370C*-mutierten Kanal beobachtet werden?
2. Kann die σ -Pore unabhängig von der α -Pore in Kaliumkanälen existieren?
3. Können Doppelmutationen (M390F, A413F, Y395W, W384F, T392Y, V393L) im Hintergrund des *hKv1.3_V388C*-mutierten Kanals an Positionen, die vermutlich die σ -Pore bilden, den σ -Strom verändern?

2 Material und Methode

2.1 Ortsspezifische Mutagenese

Die neuen mutierten Kanäle wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) hergestellt und durch Sequenzieren verifiziert (Tab. 1).

Kanal	Substitution
<i>hKv1.3V388C</i>	M390F
	A413F
	Y395W
	W384F
	T392Y
	V393L
<i>hKv1.2_wt</i>	V370C

Tab. 1. Die hergestellten Mutanten. Die Buchstaben sind die Standardabkürzungen der Aminosäuren.

Die neuen Konstrukte befinden sich im pCMV-Vektor (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) und wurden in *E.coli* amplifiziert und danach gereinigt (Abb. 2).

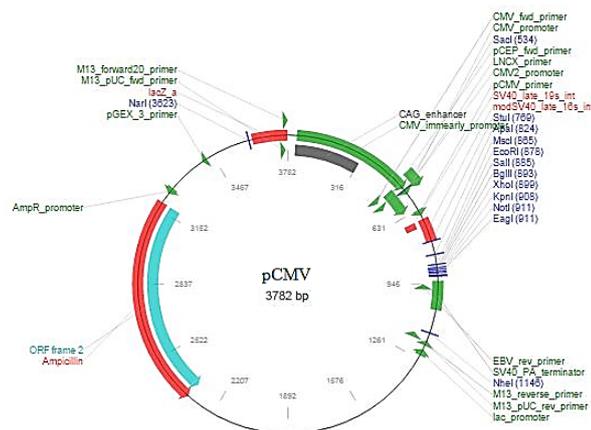


Abb. 2. Der Vektor pCMV (www.addgene.com) war Ausgangsvektor und diente als Basis für alle Konstrukte. Er ist ca. 3,7 Kbp groß, hat CMV-, SV40- und T7-Promoter, Polylinker und ORF für Selektionsmarker (in

meinem Fall Ampicillin). Das Bild des Vektors wurde mit Hilfe des Programms BioVL Virtual Lab Bench visualisiert.

2.2 Herstellung des trimeren hKv1.3_EGFP-Kanals

Es sollte ein Konstrukt mit drei verlinkten hKv1.3_V388C mit EGFP am C-Terminus entstehen. Der Linker soll aus drei Alaninen bestehen und drei cDNA *hKv1.3_V388C* zusammenbinden (Abb. 3).

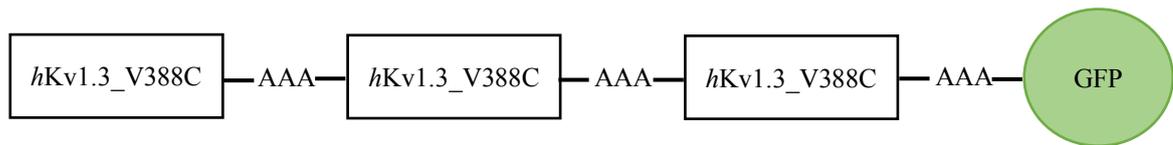


Abb. 3. Die schematische Darstellung des trimeren *hKv1.3_V388C_EGFP*-Kanals.

Es wurde folgende Strategie gewählt: Der Linker AAA wurde an den C-Terminus mit der ortsspezifischen Mutagenese des *hKv1.3_V388C* angehängt. Dafür wurde das Konstrukt *hKv1.3_V388C* im pCMV-Vektor genutzt.

Klonieren

- Mit folgenden Klonierungsprimern (Thermo Fischer, Mannheim) wurde *hKv1.3_V388C* amplifiziert:

Primer	Sequenz	Tm
forward	TCCGGCGCTCGACGGCGGGCTG	67,9
back	AACATCGGTGAATATCATTGATGTTGACACA	58,2

- Die gewünschten DNA-Sequenzen wurden mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) *in vitro* amplifiziert. Nach 25 Zyklen wurde die Amplifikation gestoppt.
- Typischer PCR-Ansatz:

10x-Puffer (New England Biolabs) 5,0µl

dNTP-Mix (2,0mM; Pharmacia) 1,0µl

forward-Primer (10 μ M) 0,5 μ l
reverse-Primer (10 μ M) 0,5 μ l
DNA Template (ca. 0,01 μ g/ μ l) 1,0 μ l
Pfu-Polymerase (5U/ μ l, New England Biolabs) 1,0 μ l
H₂O bis Volumen 50 μ l

- PCR-Bedingungen: 3 min 95°C (ein Zyklus); 40 s 95°C, 56 s 53°C, 4 min 30 s 68°C (25 Zyklen); 15 min 65°C (ein Zyklus)

1. Die Schnittenden des *hKv1.3_V388C*-Vektors wurden mit kurzen Sequenzen AAGTC blunt gemacht.
2. Das Produkt wurde anschließend mit T4-Ligase dimerisiert. Ich habe folgenden Ansatz verwendet: DNA 300ng, 10x T4-DNA-Ligase-Puffer 1,0 μ l, H₂O bis Volumen 10 μ l. Die Ligation wurde über Nacht bei 5°C durchgeführt. Die T4-DNA-Ligase wurde von New England Biolabs (NEB, Ipswich, USA) bezogen. Die Orientierung von Abschnitten im Dimer (*hKv1.3_V388C-hKv1.3_V388C*) wurde durch Sequenzieren überprüft.
3. Ein weiteres einzelnes *hKv1.3_V388C*-Konstrukt wurde mit Tru9I geschnitten und dann dephosphoryliert:

Tru9I (MseI) 1 1523 t/taa
...tcaaaaagatattcaccgatgtt**taa**.... base pairs
...agtttttctataagtggctacaaatt..... 1501 to 1526

4. Dieses einzelne Konstrukt wurde mit dem vorher hergestellten Dimer ligiert.
5. Das trimere *Kv1.3_V388C*-Konstrukt wurde jetzt in den pcDNA3_EGFP-Vektor umklontiert.

Das Konstrukt wurde in *E.coli* amplifiziert und danach gereinigt.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Medien und Kultivierung der Zellen

Für die Expression von Kanälen wurden die adhärenzte Ziellinie COS-7 und HEK 293 (Deutsche Zellkultursammlung, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden nach dem Standard-Protokoll in DMEM-high-Glukose gezüchtet. Die Kulturflaschen mit Zellen wurden bei 37 °C und in gesättigt-feuchter Atmosphäre mit 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Alle Arbeiten, z. B. Passagieren, Transfektion, Lyse etc., wurden aseptisch durchgeführt. Nach Erreichen von ca. 95 % Konfluenz wurden die Kulturen passagiert. Zum Passagieren wurde zuerst die Flüssigkeit aus den Flaschen entfernt und die Zellen wurden mit PBS (phosphate buffer solution) gewaschen. Danach folgte der zweite Waschschrift mit einer kalten PBS/EDTA-Lösung (Phosphate Buffer Solution with ethylenediaminetetraacetic acid), damit die abgestorbenen Zellen und der Rest des Kulturmediums entfernt werden. Mit der Zugabe von 1 ml vorgewärmter Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Zellen von der Flasche gelöst und nach einminütiger Inkubation im Brutschrank mit 15 ml Medium versetzt und resuspendiert. Im Verhältnis 1:5 wurde die Suspension in neue Flaschen überführt. Das Volumen von 25 ml wurde durch Zugabe des neuen Mediums erreicht.

2.3.2 Transfektion der Zellen

Die Transfektion wurde mit Hilfe des Fugene[®] Transfektionsprotokolls (www.promega.de) durchgeführt. Die leuchtenden Zellen wurden nach zwölf Stunden mit Hilfe des Mikroskops gezählt. Die Effizienz wird in Form der Prozentangabe dargestellt und bedeutet, wie viel Prozent der Zellen in der Kultur nach der Behandlung transfiziert sind. Im Versuch mussten die Konzentrationen der DNA und des Fugenes[®] optimiert werden. Die Transfektion wurde in Anwesenheit des Serums gemacht, weil der Hersteller keinen negativen Einfluss des Serums auf die Effizienz der Prozedur festgestellt hat. Die Zellen wurden transfiziert bei einer Konfluenz von 90 %. Das Plasmid des *hKv1.3_V388C*-Trimers wurde in den Mengen von 0,1 bis 0,6 µg pro 10.000 Zellen eingesetzt. Die Menge DNA zu Reagenz war zwischen 1:2 und 1:4.

Transfektionseffizienz der Zelllinien mit dem Trimer *hKv1.3_V388C-EGFP-Kanal*

In der Tabelle sind die Ergebnisse der Transfektion mit dem Trimer *hKv1.3_V388C-EGFP* in COS-7 und HEK-Zellen angegeben. Die Inkubation wurde in serumfreiem DMEM 24 Stunden lang durchgeführt. Ab 0,2 µg transfizierter DNA pro 10.000 Zellen wirkten zytotoxisch: Die Zellen verloren den adhärenen Zustand und bildeten zytoplasmatische und membranständige Konglomerate. Diese Wirkung von Fugene® wurde bei höheren Konzentrationen noch verstärkt. Bei einer Konfluenz von 90 % betrug die maximale Transfektionsrate in COS-7-Zellen mit Fugene® 19,9 %. Durch die Zugabe im Verhältnis 1:3 (0,2 µg DNA und 0,6 µl Fugene® pro 10.000 Zellen) wurde die höchste Transfektionseffizienz in COS-7 Zellen erreicht (Tab. 2). Mit dieser Konzentration von Fugene® und DNA wurden die Zellen für alle Versuche transfiziert.

Tab. 2. Effizienz der Transfektion mit Reagenzen des Trimers des *hKv1.3_V388C-EGFP-Kanals* in COS-7-Zellen und HEK-293-Zellen. Die Anzahl der transfizierten Zellen wurde durch die gemeinsame Anzahl der Zellen dividiert und anschließend auf 100% multipliziert. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde nach 24 Stunden durchgeführt.

Reagenz	Ratio DNA/Reagenz	Effizienz [%]	
		COS 7	HEK293
Fugene®	1 : 1	0,1±0,05	1±0,04
	1 : 1,5	3,1±0,05	3,1±0,01
	1 : 1,6	4,6±0,1	6,5±0,1
	1 : 1,7	9,0±0,05	7,0±0,01
	1 : 1,8	10,8±0,04	7,5±0,04
	1 : 2	13,5±0,01	8,1±0,05
	1 : 2,5	16,8±0,02	9,1±0,02
	1 : 3	20,1±0,04	12,5±0,04

Das für die Transfektion verwendete nicht-liposomale Fugene[®]-Reagenz enthält kationische Lipide. Diese kationischen Lipide besitzen vier funktionelle Einheiten: eine positiv geladene Kopfgruppe, eine Spacergruppe unterschiedlicher Länge, ein Verbindungsteil und einen hydrophoben Anker. Die Kopfgruppe ist essentiell für die Transfektionskompetenz, denn sie bindet die DNA über elektrostatische Wechselwirkungen und kondensiert DNA zu kleinen, transportfähigen Gebilden, den Lipoplexen. Das riesige DNA-Konstrukt des Trimers bekommt in der Lösung eine große negative Ladung, die durch positiv geladene Kopfgruppen kompensiert werden soll. Wenn die Ladung des Komplexes gleich null ist, wird die 3D-Struktur verändert und die Lipoplexe können durch die Zelle aufgenommen werden. Deshalb braucht man bei der Transfektion mit dem Trimer des *hKv1.3_V388C*-EGFP-Kanals eine große Konzentration von kationischen Lipiden, um die große negative Gesamtladung zu minimieren. Eine Analyse meiner Daten zeigt diesen Trend und entspricht damit dem theoretischen Konzept. Meine Ergebnisse zeigen klar, dass der Aufnahmemechanismus nicht nur von der verwendeten Konzentration, sondern auch vom verwendeten Zelltyp abhängig ist.

2.3.3 Proteinextraktion aus kultivierten Zellen

Um die Expression der neuen Mutanten zu prüfen, musste ich die Proteine in den Zellen nachweisen. Vor der Lyse wurde das Medium von den Zellen entfernt und sie wurden mit PBS gewaschen. Ohne Verzögerung wurden pro Kulturschale 200 µl Lysepuffer (10 % Glycerol, 10mM Tris-HCL (pH 6,8), 1 % NP 40, 5 mM Dithiothreitol, 0,5 mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride mit je 1 mg/l Aprotinin, Pepstatin und Leupeptin in PBS) dazu pipettiert. Mit dem Zellschaber wurden dann die Zellen von der Schale getrennt und mit der Pipette in ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt. Die Suspension wurde immer auf Eis gehalten und 3 min lang manuell mit dem Homogenisator zerkleinert. Im letzten Schritt wurde das Lysat bei 1000 g, 4 °C für 20 min. zentrifugiert, so dass sich die Proteine im Überstand befanden. Die Überstände wurden in Trockeneis eingefroren.

Die in Trockeneis eingefrorenen Überstände wurden grob per Hand zerkleinert. Bei diesem Schritt ist die temporäre Abkühlung der Proben wichtig. Die Proben wurden mit 1 ml Proteinextraktionspuffer (Tab. 3) und Keramikkugeln beladen und in dem Homogenisator platziert, wo sie bei 4 °C homogenisiert und danach durch ein Netz (Cell strainer BD) filtriert

wurden. Dabei wurden große Zellklumpen und Zellteile entfernt. Der Niederschlag wurde verworfen und das Lysat wurde 10 Minuten bei 4 °C, 200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde von der Fettschicht getrennt, aliquotiert und bei -80 °C bis zur Verwendung eingefroren.

Die Auflösung von Zellen wurde mit Hilfe von Detergenzien und mechanischen Zerstörungen durchgeführt. Die Bedingungen wurden so mild als irgend möglich gewählt. Bei der Lyse setzen die Zellen Proteasen frei. Um die Proteindegradation von Kanälen zu vermeiden, wurde die Lyse in Anwesenheit von Proteininhibitoren durchgeführt. Die Proben wurden während des gesamten Lyseprozesses im Eisbad gehalten. Als Detergenz wurde NP-40 (Abcam, Darmstadt) in möglichst niedriger Konzentration ausgewählt. Das hat mir die Möglichkeit gegeben, die spezifischen Antikörperbindungsstellen zu schonen und den unspezifischen Hintergrund an gelösten Proteinen zu minimieren.

2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die äquivalente Aufladung des Proteins (10 µg Gesamtprotein) habe ich das Gesamtprotein in den Proben bestimmt. Dafür wurde die robuste photometrische Methode von Bradford gewählt. Die Eichgerade wurde mittels einer BSA-Konzentrationsreihe (bovine serum albumin) (1-20 µg) erstellt. Die 50 µl des Lysats wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz vermischt und 10 min in der Dunkelkammer gehalten. Die Bradford-Stammlösung enthält 350 mg Serva Blue G, 100 ml Ethanol 96 % und 200 ml 88 % Phosphorsäure. Die Arbeitslösung wurde durch die Verdünnung mit Wasser aus der Stammlösung hergestellt (425 ml A. bidest. und 30 ml Bradford-Stammlösung). Die Extinktion wurde bei 595 nm (24 °C) gemessen.

2.3.5 Subzelluläre Fraktionierung von Membranproteinen und Immunoaffinitätschromatographie

Die differentielle Zentrifugation ist ein gutes Verfahren zum Anreichern von Makromolekülen. Aus den Proben wurden schrittweise durch die Zentrifugation verschiedene Komponenten der Zelle isoliert. Zu der aufgetauten Probe wurden 5 ml eiskalter Homogenisierungspuffer (Tab. 3) zugegeben und durch den Schüttler gerührt. Der erste Zentrifugationsschritt (4 °C und 1000 x g (= 3000 Upm)) dauerte 15 min und im

Niederschlag befanden sich Zelltrümmer und Zellkerne, der Schritt 2 dauerte 30 min (4 °C und 10000 x g (= 9700 Upm)) und im Pellet waren Mitochondrien und Lysosomen. Der dritte Zentrifugationsschritt führte zum Erhalt von Pellet 3, in dem sich Zellmembranen befanden. Dieser Schritt (4 °C und 112000 x g (= 50000 Upm)) dauert eine Stunde und wurde in einer Ultrazentrifuge durchgeführt. Nach jeder Zentrifugation wurden die Überstände gesammelt und sofort im nächsten Schritt eingesetzt. Pellet 3 wurde in 1000 µl Solubilisierungspuffer (Tab. 3) aufgenommen und resuspendiert.

Tab. 3. Zusammensetzung der verschiedenen Pufferlösungen.

Puffer	Zusammensetzung
Homogenisierungspuffer	5 mM Tris-HCl, pH 7,4, 300 mM Sucrose, 1:100 Proteaseinhibitor-Cocktail
Solubilisierungspuffer	20 mM Tris, pH 7,4, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 % Glycerol, 0,5 % Chaps, 1:100 Proteaseinhibitor-Cocktail
Proteinextraktionspuffer	10 % Glycerol, 10mM Tris-HCL (pH 6,8), 1 % NP 40, 5mM Dithiothreitol, 0,5mM Phenylmethylsulfonyl-Fluoride mit je 1mg/l Aprotinin, Pepstatin und Leupeptin in PBS
Blockierungspuffer	2 % Milchpulver in PBS
Laemmlipuffer	100 mM Tris pH 6,8, 4 % SDS, 200 mM DTT, 10 % Glyzerin

Mit dem Immunopräzipitations-Kit (Protein A) Roche (Penzberg, Deutschland) wurden aus der Membranproteinfraktion Kv-Proteine isoliert. Die Protein-A-Sepharose wurde nach dem Protokoll zusammen mit 5 µg Antikörpern (hKv1.3 und hKv1.2 polyclonal goat Ab, Alamone labs, Jerusalem, Israel) bei 4 °C gemischt und für 1,5 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Kügelchen mit dem PBS gewaschen. Danach wurde zur Suspension 50 µl Lysat zugegeben und weitere 1,5 Stunden im Kühlraum inkubiert. Die Sepharose-Kügelchen wurden auf PolyPrep-Säulen (Bio-Rad) mit einer Kanüle aufgeladen

und sorgfältig mit 3 ml PBS gewaschen. Danach wurde die Protein-A-Sepharose im 500 μ l PBS suspendiert und in 1,5-ml-Gefäße überführt. Die Kügelchen wurden abzentrifugiert (400 x g, 4 °C, 1 min) und 25 μ l 2x Laemmlipuffer (Tab. 3) wurde dazugegeben und wieder zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und bis zur Blot-Analyse bei -20 °C eingefroren.

2.3.6 Dot Blot

Dot Blot ist ein einfaches, schnelles und auch sensibles Verfahren, bei dem die Antigene direkt als Suspension punktförmig und konzentriert auf die Membran gebunden und anschließend detektiert werden. Durch die Filtration kann man die Proteine auf der Membran aufkonzentrieren. Diese Methode kann zur groben Abschätzung der Konzentration von Kaliumkanälen dienen.

Durch Dot Blot wurden die Kanäle nachgewiesen. Die Identifikation erfolgte durch die Lumineszenz. Für den Dot Blot wurde zuerst die Nitrozellulosemembran im Rotiblock (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) angespannt und Aliquoten (5 μ l) wurden aufgetragen. Die Membran wurde ausgetrocknet und 60 min mit der Blockierlösung (Tab. 3) behandelt.

Nach drei Spülschritten wurden auf die Membran die mit Peroxidase markierten Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, USA) zugegeben. Die Membran wurde von nicht gebundenen Antikörpern mehrmals gespült und mit Chemilumineszenzsubstrat ECL (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Deutschland) für 1 min benetzt. Die Lumineszenz wurde mit einem LAS-4000-Imager (Amersham, Tokyo, Japan) gemessen und dokumentiert.

2.4 Modellieren

Aktuelle Computertechniken für das Modellieren von Transmembranprotein-Komplexen erlauben das Modellieren eines *hKv1.3*-3D-Modells. In meinem Fall habe ich als Vorlage die Atomkoordinaten des *hKv1.2* (2A79) verwendet. Die Vergleichsproteinstrukturmodellierung von *hKv1.3* wurde mit Hilfe des Programms Yasara gemacht (<http://www.yasara.org/>). Mit dem Viewer-Programm Pymol wurde das erstellte Homologiemodell visualisiert. Danach berechnet das Programm Caver (<http://caver.cz>) automatisch ein Modell der σ -Pore ohne Benutzereingriff und innerhalb weniger Minuten

auf einem normalen Pentium-Prozessor. Das Modell der σ -Pore wurde mit dem Programm PoreWalker (<http://www.ebi.ac.uk>) validiert. Dieses Programm sagt Poren in Transmembranproteinen vorher.

2.5 Aufbau der Patch-Clamp-Apparatur

Patch-Clamp

Die am häufigsten eingesetzte Konfiguration der Patch-Clamp-Technik ist die „whole-cell“-Konfiguration. Mit Hilfe eines Mikromanipulators (Eppendorf, Deutschland) führt man die Pipette zur Zelle. Ein $G\Omega$ (hochohmiger Widerstand) zwischen Pipette und Zellmembran entsteht. In der Pipette herrscht Überdruck. Beim Kontakt zwischen Pipette und Zellmembran wechselt der Druck in der Pipette über einen Schlauch auf Unterdruck. Durch Anlegen des Unterdrucks wird die Zellmembran aufgebrochen. Die Pipettenlösung und das Zytoplasma verbinden sich. Für die Messung des Membranpotentials und von Ganzzellströmen muss man eine Reihe von Kompensationen machen. Es wird z. B. das Nullpotential zwischen Patch-Elektrode und Badlösung bestimmt.

Der gesamte Messstand befand sich in einem separaten Raum. Zum Messplatz für die elektrophysiologischen Versuche gehörte ein inverses Mikroskop Axiovert 25 mit den Objektiven 10, 40 und 60 (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland), das auf dem pressluftgedruckten Tisch (Newport Corporation, Irvine, USA) installiert war. Das Mikroskop verfügte über eine Fluoreszenzeinheit (Xenonlampe mit entsprechenden Filtersätzen), um die GFP-transfizierte Zellen zu identifizieren. Als Mikromanipulator wurde der Micromanipulator 5171 von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) genutzt. Der Verstärker EPC-9 (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht, Deutschland) wurde mit einem Dell-Computer verbunden.

Die verwendeten Elektroden wurden aus einem Silberdraht gefertigt und danach ausreichend chloriert. Die Patch-Pipetten wurden aus Glaskapillaren (Science Product GmbH, GB150-TF10) mit Hilfe des Zeitz DMZ Universal Puller (Zeitz Instruments Vertrieb GmbH, München, Deutschland) gefertigt. Die Pipetten wurden in drei Stufen gezogen und anschließend feuerpoliert. Der Pipettenwiderstand befand sich im Bereich von 1-3 $M\Omega$.

2.6 Durchführung von elektrophysiologischen Messungen

Die Messungen wurden bei einer Raumtemperatur von ca. 22 °C in der Ganzzellkonfiguration der Patch-Clamp-Technik durchgeführt (Hamill et al., 1981). Die Ströme wurden durch einen 2,9-KHz-Bessel-Filter gefiltert und die Kapazitiven- und Leck-Ströme wurden nicht subtrahiert.

Die Zellen wuchsen auf Deckgläsern, die von einem Teflonring umgeben waren. Der Ring bildete das Reservoir für die Badlösung und diente auch als Begrenzung der Badkammer. Die Lösungen wurden durch ein Silikonschlauchsystem manuell durch 5-ml-Spitzen gewechselt. Die Badelektrode war durch eine Agarbrücke mit der Badlösung verbunden.

Lösungen und Reagenzien

Die Osmolaritäten der Lösungen wurden mithilfe des Osmometers Osmat 030 (Gonotec GmbH, Berlin) kontrolliert und waren im Bereich von 290-310 mosm/l. Zum Einstellen des pH-Werts wurde ein CG-837-pH-Meter (Schott Instruments GmbH, Mainz) verwendet. Die Standard-Intrazellulärlösung enthielt 145 mM KF oder NaF, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA und 10 mM HEPES und wurde auf pH 7,2 mit NaOH oder KOH eingestellt. Die Zusammensetzung der externen Badlösungen ist in der Tabelle gelistet. Alle Lösungen wurden mit einer einmolaren Lösung des jeweiligen Hydroxids auf pH 7,4 eingestellt (Tab. 4).

Tab. 4. Zusammensetzung der verwendeten Badlösungen.

[Kat ⁺] _e	In mM	CaCl ₂	KCl	MgCl ₂	HEPES
[K ⁺] _e	164,5	2	164,5	1	5
[Li ⁺] _e	164,5	2		1	5
[Na ⁺] _e	160	2	4,5	1	5
[Cs ⁺] _e	164,5	2		1	5
[NH ₄ ⁺] _e	164,5	2		1	5
[Rb ⁺] _e	164,5	2		1	5

Die Toxine CTX und MTX wurden in [Na⁺]_e-Lösung mit 0,1 % Rinderalbumin gelöst und bis zur Anwendung bei -20 °C gelagert.

Auswertung der Daten

Die Analyse der Daten wurde mit den Programmen Fitmaster v2.15 (HEKA Elektronik GmbH) und Igor Pro 3.1.2 (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, Oregon) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Elektrophysiologische Untersuchung der *hKv1.3_V388C*- und *hKv1.2_V370C*-Kanäle

Um zeigen zu können, ob auch durch andere Kaliumkanäle als durch *hKv1.3*-Kanäle σ -Ströme fließen können, möchte ich zuerst die schon bekannten Ströme durch die mutierten Kanäle *hKv1.3_wt* und *hKv1.3_V388C* zeigen.

Abb. 4A zeigt die typischen Rampenströme durch *hKv1.3_wt*-Kanäle in Badlösungen, die 4,5 [K⁺]_o (schwarze Spuren) oder 164,5 mM [K⁺]_o (rote Spuren) enthalten. Wie ich das von einem spannungsabhängigen Kaliumkanal erwartete, konnte ich kaum einen Strom bei Potentialen von -200 bis -60 mV messen (Abb. 1A). Sobald Kanäle geöffnet wurden, bei positiveren Potentialen als -40 mV, konnte ich einen Auswärtsstrom in [4,5 K⁺]_o beobachten (schwarze Spur) und einen Einwärtsstrom in [164,5 K⁺]_o, der dann bei etwa 0 mV auswärts gerichtet war (rote Spur). Im Gegensatz dazu zeigten Rampenströme durch *hKv1.3_V388C*-Kanäle (Abb. 4B) einen großen Einwärtsstrom in [4,5 K⁺]_o bei negativeren Potentialen als -100 mV (schwarze Spur). In [164,5 K⁺]_o zeigten die mutierten Kanäle *hKv1.3_V388C* (rote Spur Abb. 4B) einen ähnlichen Rampenstrom wie den, den ich in den *hKv1.3_wt*-Kanälen beobachtet hatte (vergleiche Abb. 4A und B, rote Spuren), mit einem kleinen Einwärtsstrom um die -40 mV und wenig Einwärtsstrom bei Potentialen von -200 bis -100 mV.

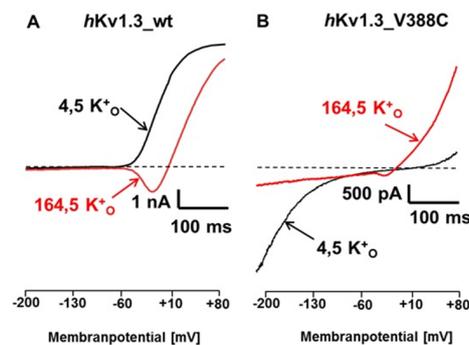


Abb. 4. Typische Rampenströme durch *hKv1.3_wt*- (A) und *hKv1.3_V388C*-Mutantenkanäle (B) in Badlösungen mit 4,5 [K⁺]_o (schwarze Spuren) oder 164,5 [K⁺]_o (rote Spuren). Die Ströme wurden durch 400 ms Spannungsrampen von -200 bis +80 mV alle 30 s von einem Haltepotential von -120 mV ausgelöst. Ich habe 25 Zellen (Bild A) und 20 Zellen (Bild B) bearbeitet und in 22 Zellen (Bild A) oder 17 (Bild B) wurden die Ströme gemessen. Abb. aus Tyutyayev, P., Grissmer, S., 2017, Seite 4 (Abb. 1 A+B).

Die hier beschriebenen Ergebnisse an den mutierten Kanälen *hKv1.3_wt* und *hKv1.3_V388C* bestätigen die Ergebnisse von Prütting et al. (2011). Die Autoren beschrieben, dass die *hKv1.3_V388C*-Kanalmutante zwei Poren besitzt: einmal eine zentrale K⁺-selektive α -Pore wie die im *hKv1.3_wt* und eine zweite Pore, die sogenannte σ -Pore, die bei Potentialen negativer als -60 mV offen ist, bei denen die α -Pore normalerweise geschlossen ist. Ob der mutierte Kanal *hKv1.2_V370C* auch Ströme durch eine σ -Pore zeigt, werde ich im nächsten Paragraphen beschreiben.

Ströme durch die mutierten Kanäle *hKv1.2_wt* und *hKv1.2_V370C* (Abb. 5) zeigten fast identische Eigenschaften wie oben in Abb. 4 gezeigt und beschrieben für Ströme durch *hKv1.3_wt* und *hKv1.3_V388C* mutierte Kanäle. Bei negativeren Potentialen als -40 mV zeigte sich kaum ein Strom durch *hKv1.2_wt*-Kanäle in beiden Badlösungen (Abb. 5A).

Durch die *hKv1.2_V370C*-Kanäle ist ein großer Einwärtsstrom in [4,5 K⁺]_o zu sehen (Abb. 5B, schwarze Spur), der in [164,5 K⁺]_o viel kleiner wurde. Durch den *hKv1.2_wt* ist dieser Einwärtsstrom nicht zu beobachten. Die beiden σ -Ströme durch die mutierten Kanäle *hKv1.3_V388C* und *hKv1.2_V370C* unterscheiden sich von dem Strom durch die *hKv1.3_wt*- und *hKv1.2_wt*-Kanäle, indem sie bei Potentialen negativer als -100 mV zu beobachten sind (Abb. 5). Bei solchen negativen Potentialen leiten die Wildtyp-Kanäle keine Ströme durch die α -Pore.

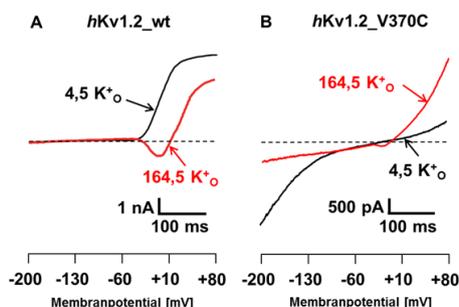


Abb. 5. Typische Rampenströme durch *hKv1.2_wt*- (A) und *hKv1.2_V370C*-Mutantenkanäle (B) in Badlösungen mit 4,5 [K⁺]_o (schwarze Spuren) oder 164,5 [K⁺]_o (rote Spuren). Die Ströme wurden durch 400 ms Spannungsrampen von -200 bis +80 mV alle 30 s von einem Haltepotential von -120 mV ausgelöst. Ich habe 20 Zellen (Bild A) und 18 Zellen (Bild B) bearbeitet und in 17 Zellen (Bild A) oder 16 (Bild B) wurden die Ströme gemessen. Abb. aus Tyutyayev, P., Grissmer, S, 2017, Seite 4 (Abb. 1 C+D).

Um den Zeitverlauf der σ -Stromaktivierung in *hKv1.3*- und *hKv1.2*-Kanälen messen zu können, habe ich die folgenden Experimente durchgeführt, in denen zuerst der Strom durch die α -Pore durch depolarisierende Spannungsschritte induziert wurde und anschließend zu hyperpolarisierenden Potentialen gesprungen wurde, um zu sehen, ob und wie schnell der σ -Strom dabei induziert wird. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 zu sehen. Ströme durch *hKv1.3_wt*-Kanäle in $[4,5 \text{ K}^+]_o$ (Abb. 6A) aktivieren sehr schnell, erreichen innerhalb von 20 ms einen Spitzenwert und inaktivieren dann mit einer Zeitkonstante von etwa 250 ms. Im Gegensatz dazu zeigten die *hKv1.3_V388C*-mutierten Kanäle in der gleichen Badlösung ($[4,5 \text{ K}^+]_o$) einen Auswärtsstrom während der Depolarisation, der nach Erreichen eines Spitzenstromes eine starke Stromabnahme während der Depolarisation zeigte (Abb. 6B). Diese Stromabnahme war auf eine verstärkte C-Typ-Inaktivierung zurückzuführen, verglichen mit Strömen durch die α -Pore des *hKv1.3_wt*-Kanals, implizierte aber gleichzeitig einen Stromfluss während der Depolarisation durch die funktionelle α -Pore der *hKv1.3_V388C*-mutierten Kanäle. Bei der nachfolgenden Hyperpolarisation zeigte sich ein großer Einwärtsstrom.

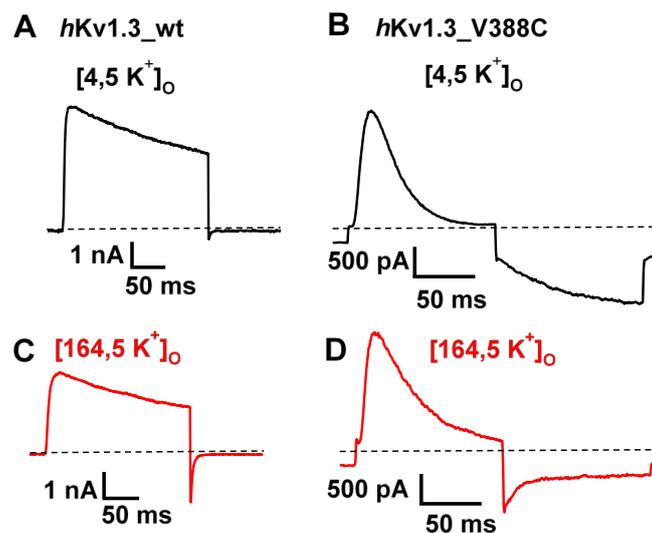


Abb. 6. Ströme durch *hKv1.3_wt*- und *hKv1.3_V388C*-Mutantenkanäle. Die Ströme wurden ausgelöst in $[4,5 \text{ K}^+]_o$ (schwarze Spuren) und in $[164,5 \text{ K}^+]_o$ (rote Spuren) durch 100 ms (B und D) oder 200 ms (A und C) depolarisierende Spannungsschritte vom Haltepotential von -120 mV auf $+40 \text{ mV}$ gefolgt von 100 ms hyperpolarisierenden Spannungsschritten auf -180 mV . Ich habe 24 Zellen (Bild A, C) und 18 Zellen (Bild B, D) bearbeitet und in 20 Zellen (Bild A, C) oder 14 (Bild B, D) wurden die Ströme gemessen. Abb. aus Tyutyayev, P., Grissmer, S., 2017, Seite 5 (Abb. 2 A, B, C, D).

In $[164,5 \text{ K}^+]_o$ zeigte der Auswärtsstrom wie erwartet während der Depolarisation sowohl in *hKv1.3_wt*- (Abb. 6C) als auch in *hKv1.3_V388C*-mutierten Kanälen (Abb. 6D) eine langsamere C-Typ-Inaktivierung, wohingegen der Zeitverlauf des Einwärtsstroms während der Hyperpolarisation durch *hKv1.3_V388C*-mutierte Kanäle sehr unterschiedlich war, je nach Extrazellulärlösung (vergleiche Abb. 6B und 6D): Der Einwärtsstrom bei -180 mV in $[4,5 \text{ K}^+]_o$ nahm in seiner Amplitude zu, der Strom in $[164,5 \text{ K}^+]_o$ zeigte zuerst einen instantanen Sprung auf etwa 1 nA und wurde dann kleiner. Beide Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen (Prütting et al., 2011) und wurden so gedeutet, dass der größer werdende Strom in $[4,5 \text{ K}^+]_o$ in *hKv1.3_V388C*-Kanälen während der Hyperpolarisation durch die σ -Pore fließt, wohingegen der Strom in $[164,5 \text{ K}^+]_o$ während der Hyperpolarisation durch die α -Pore fließt. In Abb. 6 ist deutlich zu sehen, dass in $[4,5 \text{ K}^+]_o$ σ -Strom durch den *hKv1.3_V388C*-Kanal fließt. Jetzt will ich das für den σ -Strom im *hKv1.2_V370C*-Kanal zeigen. Ähnliche Beobachtungen in Bezug auf Ströme durch α - und σ -Poren, wie oben für *hKv1.3_V388C*-mutierte-Kanäle in normaler und hoher extrazellulärer Kaliumlösung beschrieben, habe ich gemacht für Ströme durch *hKv1.2_V370C*-mutierte Kanäle: Bei +40 mV in $[4,5 \text{ K}^+]_o$ ist ein Auswärtsstrom durch die α -Pore der *hKv1.2_V370C*-mutierten Kanäle (Abb. 7B) zu sehen. Dieser Strom inaktiviert viel schneller als im *hKv1.2_wt*-Kanal (Abb. 7A) zusammen mit einem Einwärtsstrom bei einem Potential von -180 mV, der sich während der 100-ms-Hyperpolarisation in den meisten meiner Experimente (21 von 24) mit diesem Protokoll vergrößert. In einer Minderheit dieser Experimente (3 von 24) folgte dem Anstieg der σ -Stromamplitude bei -180 mV eine leichte Abnahme während dieser 100-ms-Hyperpolarisation. In $[164,5 \text{ K}^+]_o$ deaktivierte der Strom bei -180 mV langsamer (Abb. 7D) im Vergleich zum *hKv1.2_wt* (Abb. 7C) mit einem kleineren anhaltenden Einwärtsstrom im Vergleich zu Abb. 7B.

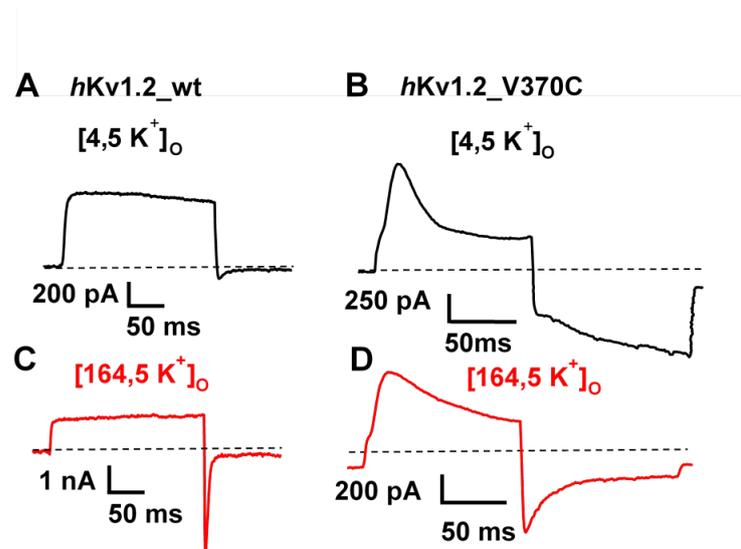


Abb. 7. Ströme durch *hKv1.2_wt*- und *hKv1.2_V370C*-Mutantenkanäle. Die Ströme wurden ausgelöst in $[4,5 \text{ K}^+]_o$ (schwarze Spuren) und in $[164,5 \text{ K}^+]_o$ (rote Spuren) durch 200 ms (A, C) oder 100 ms (B, D) depolarisierende Spannungsschritte vom Haltepotential von -120 mV auf $+40 \text{ mV}$, gefolgt von 100 ms hyperpolarisierenden Spannungsschritten auf -180 mV . Ich habe 20 Zellen (Bild A, C) und 21 Zellen (Bild B, D) bearbeitet und in 15 Zellen (Bild A, C) oder 16 (Bild B, D) wurden die Ströme gemessen. Abb. aus Tyutyayev, P., Grissmer, S., 2017, Seite 5 (Abb. 2 E, F, G, H).

σ -Ströme waren nicht durch CTX and MTX und andere α -Pore-blockierende Toxine inhibiert

Um den σ -Strom durch den *hKv1.2_V370C*-Kanal von dem Strom durch die α -Pore zu unterscheiden, habe ich CTX an die Zellen appliziert. Der Strom durch den *hKv1.2_V370C*-Kanal bei Potentialen negativer als -60 mV in $[4,5 \text{ K}^+]_o$ bleibt bei der Applikation von 700 nM CTX unverändert. Abbildung 8A zeigt deutlich, dass 700 nM CTX in $[4,5 \text{ K}^+]_o$ den Strom durch *hKv1.2_V370C*-Kanäle nicht verringern. CTX kann aber Ströme durch die zentrale α -Pore der *hKv1.2_V370C*-mutierten Kanäle in einer Badlösung mit $[164,5 \text{ K}^+]_o$ blockieren (Abb. 8B), der Einwärtsstrom im Potentialbereich von -50 bis 0 mV wurde durch 700 nM CTX komplett beseitigt.

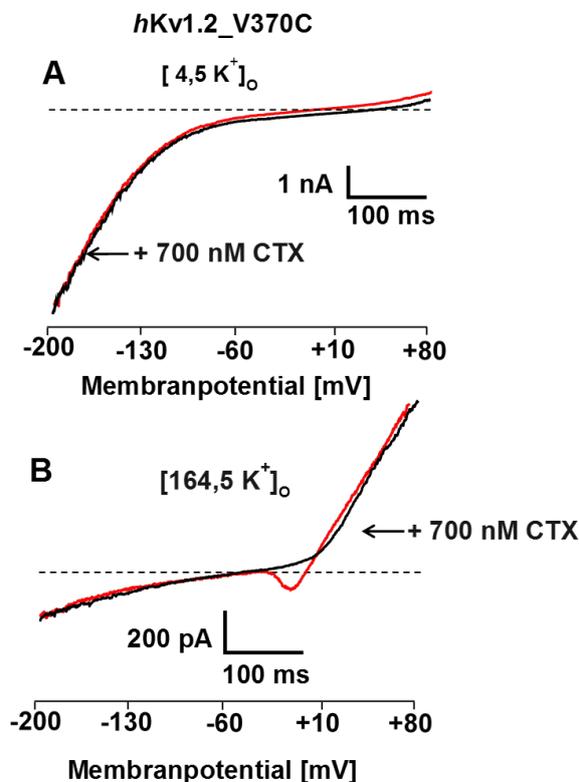


Abb. 8. Die Wirkung von CTX auf Ströme durch *hKv1.2_V370C*-Mutantenkanäle. A, B: Rampenströme durch *hKv1.2_V370C*-Mutantenkanäle in [4,5 K⁺]_o- (A) und in [164,5 K⁺]_o-Badlösung (B) vor und nach extrazellulärer Applikation von CTX. Das Protokoll der Rampenströme ist in der Legende zu Abb. 4 beschrieben. Ich habe 20 Zellen bearbeitet und in 16 Zellen wurden die Ströme nach der Zugabe von CTX gemessen. Abb. aus Tyutyaev, P., Grissmer, S., 2017, Seite 7 (Abb. 3 A+B).

In weiteren Versuchen habe ich ein Protokoll verwendet, in dem sowohl der α - als auch der σ -Porenstrom in einer Badlösung von [4.5 K⁺]_o gemessen werden konnte. Das Ergebnis dieser Messung wird in Abb. 9 gezeigt. Der Auswärtsstrom durch die α -Pore bei einem Potential von +40 mV wurde durch die Anwesenheit von 1 nM Maurotoxin (MTX) stark reduziert, wohingegen die Amplitude und auch die kinetischen Eigenschaften des Einwärtsstroms während der Hyperpolarisation auf -180 mV durch MTX nicht verändert wurden. Somit wurde die α -Pore durch das MTX blockiert und die σ -Pore nicht.

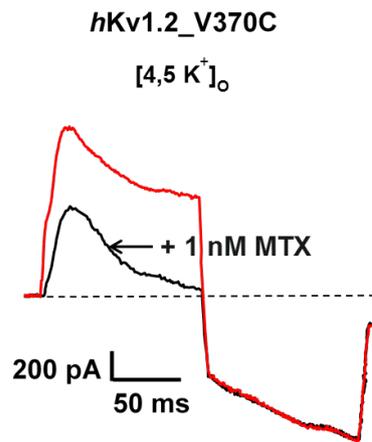


Abb. 9. Die Wirkung von 1 nM MTX (schwarze Spur) auf Ströme durch die α - und σ -Poren von *hKv1.2_V370C*-Mutantenkanälen in [4,5 K⁺]_o. Der Strom wurde ausgelöst durch 100 ms depolarisierende Spannungsschritte von dem Haltepotential von -120 mV auf +40 mV, gefolgt von einem 100 ms hyperpolarisierenden Spannungsschritt auf -180 mV alle 30 s. Ich habe 12 Zellen bearbeitet und in 10 Zellen wurden die Ströme nach der Zugabe von MTX gemessen.

Ist der σ -Strom durch *hKv1.2_V370C*-Kanäle unempfindlich gegenüber der Protonenkonzentration? Um diese Frage zu beantworten, habe ich externe Badlösungen [4,5 K⁺]_o mit unterschiedlichem pH-Wert getestet. Eine Abnahme des pH-Werts auf 5,5 oder ein Anstieg des pH-Werts auf 8,0 hatte keinen Einfluss auf den σ -Strom (blaue und rote Spuren, Abb. 10). In beiden Fällen wurde der σ -Strom nicht von H⁺ getragen. In der Lösung mit der größeren Protonenkonzentration wurde der σ -Strom sogar kleiner (Abb. 10).

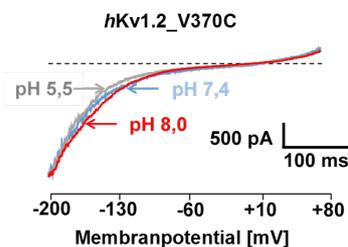


Abb. 10. Rampenströme durch *hKv1.2_V370C*-mutierte Kanäle in [4,5 K⁺]_o mit verschiedenen Protonenkonzentrationen. Die Ströme wurden jeweils induziert wie in Abb. 4 beschrieben. Ich habe 23 Zellen bearbeitet und in 18 Zellen wurden die Ströme gemessen. Abb. aus Tyutyayev, P., Grissmer, S., 2017, Seite 9 (Abb. 4 B).

Um den σ -Strom durch den *hKv1.2_V370C*-Mutantenkanal weiter zu charakterisieren, wurde bestimmt, welche Ionen durch die σ -Pore hindurchgehen könnten. Das Ersetzen von Cl^- in der Badlösung durch Aspartat hat den Einwärtsstrom nicht verändert, was nahelegt, dass der Einwärtsstrom für Cl^- nicht selektiv war (Abb. 11).

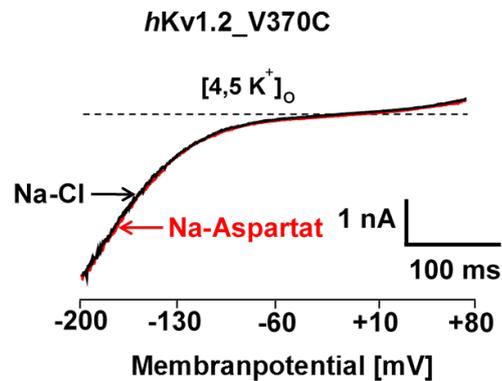


Abb. 11. Rampenströme durch *hKv1.2_V370C*-mutierte Kanäle in [4,5 K⁺]_o mit Cl^- oder mit Aspartat-Ionen. Die Ströme wurden jeweils induziert wie in Abb. 4 beschrieben. Ich habe 25 Zellen bearbeitet und in 21 Zellen wurden die Ströme gemessen. Abb. aus Tyutyayev, P., Grissmer, S., 2017, Seite 9 (Abb. 4 A).

Ionenselektivität des σ -Stroms

Um aufzuklären, welche Ionen σ -Ströme erzeugen könnten, ersetzte ich die Hauptkationen in der externen Badlösung. Rb^+ und K^+ erzeugten sehr kleine Einwärtsströme durch *hKv1.2_V370C*-Mutantenkanäle, während Cs^+ , NH_4^+ , Na^+ oder Li^+ größere Einwärtsströme bei Potenzialen negativer als -100 mV generieren konnten (Abb. 12). Aus den Amplituden der Rampenströme (I_X^+) bei -180 mV berechnete ich die Verhältnisse (I_X^+/I_{Na^+}) als Maß für die Ionenleitfähigkeit. Die Messung ergab eine Ionenpermeationseffizienz mit folgender Reihenfolge: Li^+ (1,2) > Na^+ (1) > NH_4^+ (0,75) > Cs^+ (0,73) > K^+ (0,32) > Rb^+ (0,12). Somit wird der σ -Strom am besten durch Na^+ und Li^+ getragen.

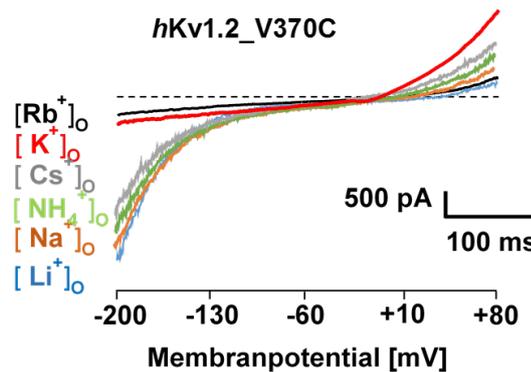


Abb. 12. Rampenströme durch *hKv1.2_V370C*-mutierte Kanäle in verschiedenen externen Badlösungen wurden wie in der Legende zu Abb. 4 beschrieben generiert. Die Hauptkationen in der Badlösung sind neben den Stromspuren angegeben. Ich habe 16 Zellen bearbeitet und in 14 Zellen wurden die Ströme gemessen. Abb. aus Tyutyaev, P., Grissmer, S., 2017, Seite 9 (Abb. 4 C).

3.2 Die σ -Pore in tetrameren und in trimeren *hKv1.3_V388C*-Kanälen

Wie ich oben schon erwähnt habe, wurde der Strom durch die σ -Pore zuerst in *hKv1.3_V388C*-Kanälen entdeckt. Die V388C-Mutation eröffnete in *hKv1.3*-Kanälen einen neuen Weg (σ -Pore) hinter der zentralen α -Pore (Prütting et al., 2011).

Um die σ -Pore weiter zu charakterisieren, habe ich einen trimeren *hKv1.3_V388C*-Kanal geschaffen, der grundsätzlich 2 σ -Poren haben könnte, weil die σ -Pore hinter dem Selektivitätsfilter zwischen zwei Untereinheiten läuft. Darüber hinaus könnte dieser trimere Kanal keinen Tetramer bilden und hätte deshalb keine kaliumselektive zentrale α -Pore.

Die σ -Pore in trimeren *hKv1.3_V388C*-Kanälen

Um prinzipiell die σ -Pore zu beweisen und von der α -Pore zu unterscheiden, habe ich einen Trimer geschaffen, der aus drei miteinander verbundenen *hKv1.3_V388C*- α -Untereinheiten besteht. Die Überexpression dieses trimeren *hKv1.3_V388C*-Kanals in COS-7-Zellen soll endlich die Antwort geben, ob die σ -Pore unabhängig von der α -Pore existieren kann und auch funktionsfähig ist. Die Klonierung des *hKv1.3_V388C*-trimeren Kanals ist im Kapitel Material und Methode beschrieben, wobei drei *hKv1.3_V388C*-Untereinheiten miteinander verbunden wurden.

Für die anschließenden Versuche sollte ich eine passende Zelllinie mit minimaler Expression von endogenen Kanälen finden und ihre Expression prüfen. Das wird detailliert in dem folgenden Kapitel beschrieben.

Zellen

Es wurden 3 Zelllinien für die Expression von Kanälen getestet: COS-7-, HEK293T- und tsA201-Zellen. Die HEK293T-produzierten endogenen Auswärtsstrom- und die tsA201-Zellen, die ein Klon von HEK293-Zellen sind, machten einen kleineren endogenen Strom. Nur COS-7-Zellen haben fast keine endogenen Kanäle, die meine Messungen stören konnten, wie in Abb. 13 zu sehen ist.

Strom durch kontroll-transfizierte COS-7-Zellen

Abb. 13 zeigt die typischen Rampenströme einer Zelle, die nur mit EGFP transfiziert wurde (Abb. 13A) in Badlösungen, die entweder 4,5 (schwarze Spur) oder 164,5 mM $[K^+]_o$ (rote Spur) enthalten. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Rampenströmen in den verschiedenen Lösungen zu beobachten. Die EGFP-transfizierte COS-7-Zelle hatte sehr kleine endogene Ströme bei Potentialen, die weniger negativ als 10 mV waren, mit geringem Auswärtsstrom bei Potentialen, die positiver als +10 mV waren (Abb. 13B).

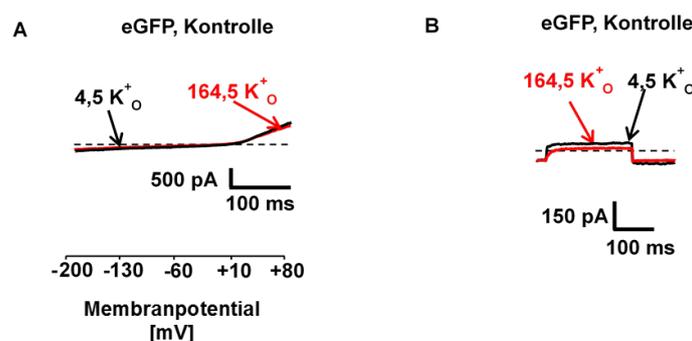


Abb. 13. Endogene Ströme in kontrolltransfizierten COS-7-Zellen. A, Rampenströme ausgelöst durch 400 ms Spannungsrampen von -200 bis +80 mV alle 30 s von einem Haltepotential von -120 mV. B, Ströme wurden ausgelöst durch 200 ms depolarisierende Spannungsschritte vom Haltepotential von -120 mV auf +40 mV gefolgt von 100 ms hyperpolarisierenden Spannungsschritten auf -180 mV. Ich habe 10 Zellen bearbeitet und in 9 Zellen wurden keine Ströme gemessen. Abb. aus Tyutyayev, P., Grissmer, S., 2018, Seite 1115 (Abb. 1 A+D).

Weil die endogenen Ströme in den mit EGFP-transfizierten COS7-Zellen so gering waren, habe ich alle weiteren elektrophysiologischen Untersuchungen zur α - und σ -Pore an COS-7-Zellen durchgeführt. Zunächst wollte ich allerdings klären, ob ich mein kloniertes trimeres Kanalkonstrukt realisieren konnte. Dies wird im nächsten Abschnitt gezeigt.

Das trimere *hKv1.3_V388C*-EGFP-Konstrukt

Die mehrstufige Klonierungsstrategie des trimeren *hKv1.3_V388C*-EGFP-Konstrukts, wie in Material und Methode beschrieben, wurde erfolgreich realisiert, wie in Abb. 14 zu sehen ist. Links auf dem Bild ist ein 5-kb-Marker aufgetragen, die zweite Spur (Bande A) ist der Dimer aus 2 *hKv1.3_V388C*-Untereinheiten und hat die Größe von 9657 bp und die dritte Bande B ist der Trimer aus 3 *hKv1.3_V388C*-Untereinheiten und EGFP mit der Größe von 11403 bp.

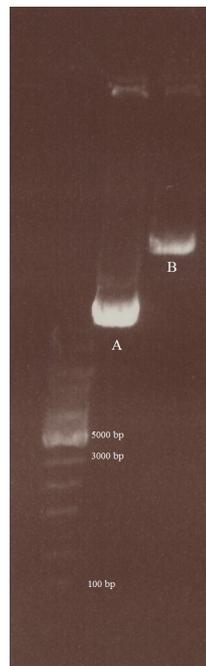


Abb. 14. Der klonierte Dimer (A) und Trimer (B) im 0,5%-Agarosegel. Links ist ein 5-kb-Marker aufgetragen.

Nach der Sequenzierung habe ich festgestellt, dass 4 von 15 analysierten Klonen die richtige Orientierung und Sequenz und keinerlei Mutationen hatten. Die hergestellten Sequenzen und Kontrollsequenzen aus Datenbanken stimmten überein. Dieser trimere Kanal und andere

tetramere Kanäle und Kanalmutanten wurden in COS-7-Zellen exprimiert. Die Expression habe ich vor der Elektrophysiologie mittels Dot Blot kontrolliert.

Nachweis von Kv-Kanälen mittels Dot Blot

Die COS-7-Zellen wurden mit entsprechenden Konstrukten transfiziert und weiter wie im Kapitel 2.3.5 beschrieben verarbeitet. Der Überstand, in dem sich die Membranfraktion von Kanälen befindet, wurde für den Dot Blot verwendet. Für den Dot Blot wurde zuerst die Nitrozellulosemembran im Rotiblock (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) befestigt und 15 µl des Überstandes wurden auf die Membran aufgetragen. Die Membran wurde ausgetrocknet und

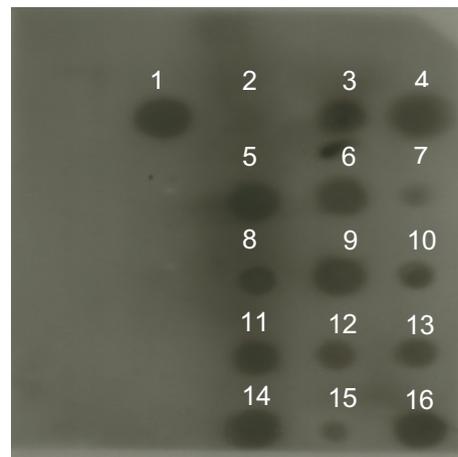


Abb. 15. Dunklere Kreise sind in allen aufgetragenen Proben außer der negativen Kontrolle sichtbar. Die Kontrolle ist Lysat von nicht transfizierten COS-7-Zellen. Es wurden gleiche Mengen von Lysat aufgetragen (1- *hKv1.3_wt*; 2- COS7; 3- *hKv1.2_V370C*; 4- *hKv1.3_V388C*; 5- *hKv1.3_V388C/Y395W*; 6- *hKv1.3_V388C/W384F*; 7- *hKv1.3_V388C/T392Y*; 8- *hKv1.3_V388C/V393L*; 9- *hKv1.3_V388C/M390F*; 10- *hKv1.3_V388C/A413F*; 11- *hKv1.3_V388C/Y395W*; 12- *hKv1.3_V388C/W384F*; 13- *hKv1.3_V388C/T392Y*; 14- *hKv1.3_V388C/V393L*; 15- *hKv1.3_V388C-Trimer*; 16- *hKv1.3_V388C*). Links wird das Feld der geblockten Membran angezeigt.

60 min mit der Blockierlösung behandelt. Nach drei Spülschritten wurden auf die Membran die mit Peroxidase markierten Antikörper zugegeben. Die Membran wurde von nicht gebundenen Antikörpern mehrmals gespült und mit Chemilumineszenzsubstrat ECL (Amersham Pharmacia, Freiburg) für 1 min benetzt. Die Lumineszenz wurde mit dem LAS-4000-Imager gemessen und dokumentiert. Nach dem Dot Blot sind auf der Membran die Kreise zu sehen und in der Kontrolle (Zellysate COS-7) nicht. Die Kreise haben verschiedene

Intensitäten (Abb. 15). Die kleineren und helleren Kreise zeigten, dass viele Mutanten schlechter als *hKv1.3_wt* in den COS-7-Zellen exprimieren. Der Trimer *hKv1.3_V388C* hat eine geringere Expression als *hKv1.3_wt*, aber sie ist vergleichbar mit der Expression anderer Doppelmutanten.

Diese Expressionsanalyse bedeutet, dass alle Kanäle sich mehr oder weniger gut in der Zellmembran von COS-7-Zellen befinden und für den entstandenen Strom verantwortlich sein können.

σ -Ströme durch die trimere *hKv1.3_V388C*-Kanäle

Um die Existenz der σ -Pore zu bestätigen, wurden von mir trimere *hKv1.3_V388C*-Kanäle erzeugt, um zu sehen, ob ich in diesen Kanälen σ -ähnliche Ströme beobachten kann, da in einem trimere *hKv1.3_V388C*-Kanal S6-Segmente immer noch miteinander interagieren sollten. Jedoch sollte eine zentrale α -Pore nicht existieren. Die Experimente mit diesen trimere *hKv1.3_V388C*-mutierten Kanälen werden in Abb. 16 gezeigt.

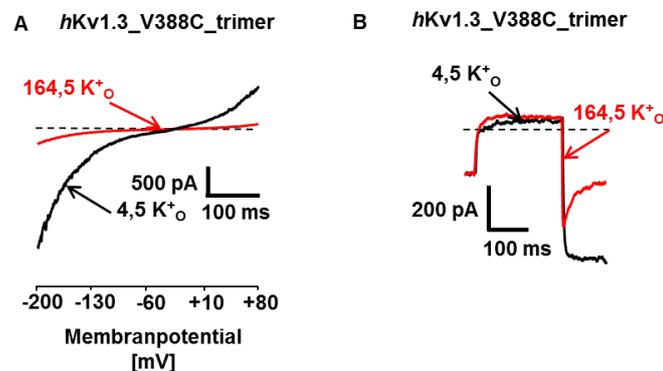


Abb. 16. Ströme durch trimere *hKv1.3_V388C*-Kanäle. A, Rampenströme durch trimere *hKv1.3_V388C*-Kanäle wurden ausgelöst wie in der Legende zu Abb. 4 beschrieben. B, Ströme durch trimere *hKv1.3_V388C*-Kanäle wurden ausgelöst wie in der Legende zu Abb. 7 beschrieben. Ich habe 21 Zellen bearbeitet und in 17 Zellen wurden die Ströme gemessen. Abb. aus Tyutyayev, P., Grissmer, S., 2018, Seite 1116 (Abb. 2).

Einwärtsströme durch trimere *hKv1.3_V388C*-Kanäle bei Potentialen negativer als -60 mV in einer Badlösung mit 4,5 mM [K⁺]_o (Abb. 16A, schwarze Spur) waren groß und ähnlich wie Ströme durch tetramere *hKv1.3_V388C*-Kanäle (vergleiche Abb. 4B, schwarze Spur).

Dies zeigt, dass σ -ähnliche Ströme auch in trimeren *hKv1.3_V388C*-Kanälen beobachtet werden können. Dieser Einwärtsstrom durch die trimeren *hKv1.3_V388C*-Kanäle ist auf den durch die σ -Pore fließenden Strom zurückzuführen. Das bestätigt auch die Reduktion des Einwärtsstroms in 164,5 [K⁺]_o-Lösung (Abb. 16A, rote Spur). Zusätzlich und wie erwartet zeigte der Rampenstrom in 164,5 [K⁺]_o (Abb. 16A, rote Spur) keinen Einwärtsstrom bei \sim 40 mV, was auf die Abwesenheit einer funktionellen spannungsabhängigen und kaliumselektiven α -Pore in trimeren *hKv1.3_V388C*-Kanälen hindeutet. Diese Annahme wurde durch die Verwendung des Protokolls mit Spannungsschritten (Abb. 16B) bestätigt. Abb. 16B zeigt den Strom ausgelöst durch Spannungsschritte durch die trimeren *hKv1.3_V388C*-mutierten Kanäle in Badlösungen, die entweder 4,5 (schwarze Spur) oder 164,5 mM [K⁺]_o (rote Spur) enthalten. Dabei wurde ein sehr kleiner Auswärtsstrom bei +40 mV in beiden Badlösungen beobachtet, wohingegen der Einwärtsstrom bei -180 mV in [4,5 K⁺]_o (schwarze Spur) größer war und nicht deaktivierte, verglichen mit dem Einwärtsstrom bei -180 mV in [164,5 K⁺]_o (rote Spur).

Die Ergebnisse aus beiden Messprotokollen (Abb. 16A und B) weisen darauf hin, dass auch in trimeren *hKv1.3_V388C*-Kanälen Strom durch die σ -Pore fließt. Im folgenden Abschnitt werde ich diesen σ -Strom in trimeren Kanälen weiter charakterisieren.

Ionenselektivität des σ -Stroms in tetrameren und trimeren *hKv1.3_V388C*-Kanälen

Um herauszufinden, welche Ionen durch die σ -Pore des Trimers durchgehen können, ersetzte ich das Hauptkation Na⁺ in der äußeren Badlösung durch Rb⁺, K⁺, Cs⁺, NH₄⁺ oder Li⁺. Wie zuvor von Prütting et al. (2011) und hier in Abb. 17A gezeigt, erhöhte der Austausch von Na⁺ durch Li⁺ die Amplitude des Stroms durch den *hKv1.3_V388C*-mutierten Tetramer leicht, während der Austausch von Na⁺ durch NH₄⁺ oder Cs⁺ die Amplitude des σ -Stroms reduzierte und K⁺ und Rb⁺ die kleinsten σ -Ströme erzeugten. Ich benutzte die Amplituden (I_X^+) der Rampenströme bei -180 mV und berechnete daraus die Verhältnisse (I_X^+/I_{Na^+}) als Maß für die Ionenleitfähigkeit. Die berechneten Ionenpermeationseffizienzen sind ähnlich denen, die früher gemessen wurden (Prütting et al., 2011) für den Strom durch die tetrameren *hKv1.3_V388C*-Kanäle in Bezug auf Na⁺ mit folgender Reihenfolge: Li⁺ (1,1) > Na⁺ (1) > NH₄⁺ (0,8) > Cs⁺ (0,69) > K⁺ (0,14) > Rb⁺ (0,11).

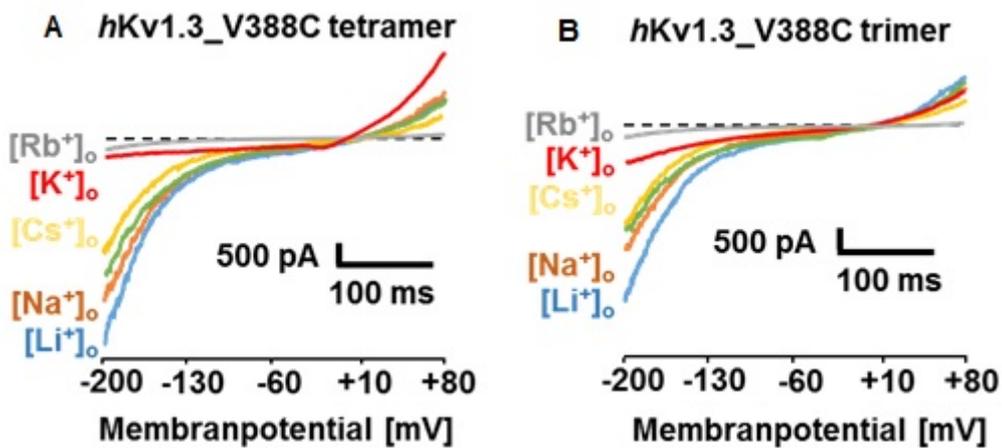


Abb. 17. Rampenströme durch tetramere (A) und trimere (B) mutierte *hKv1.3_V388C*-Kanäle in verschiedenen externen Badlösungen wurden wie in der Legende zu Abb. 4 beschrieben generiert. Die Hauptkationen in der Badlösung sind neben den Stromspuren angegeben. Ich habe 24 Zellen (Bild A) und 18 Zellen (Bild B) bearbeitet und in 17 Zellen (Bild A) oder 14 (Bild B) wurden die Ströme gemessen. Abb. aus Tyutyayev, P., Grissmer, S., 2018, Seite 1117 (Abb. 3 B+C).

Das Ersetzen des Hauptkations in der Badlösung zeigte bei den trimeren *hKv1.3_V388C*-Kanälen ähnliche Ergebnisse (Abb. 17B). Die Amplituden des Stroms durch die σ -Pore der tetrameren und trimeren *hKv1.3_V388C*-mutierten Kanäle sind vergleichbar (vergleiche Abb. 17A und B). Die Ionenpermeationseffizienz für den σ -Strom durch trimere *hKv1.3_V388C*-Kanäle bildet folgende Reihenfolge: Li^+ (1,2) > Na^+ (1) > NH_4^+ (0,75) > Cs^+ (0,73) > K^+ (0,32) > Rb^+ (0,12). Das bedeutet, dass die σ -Pore in trimeren *hKv1.3_V388C*-Kanälen eine sehr ähnliche Selektivität wie in tetrameren *hKv1.3_V388C*-Kanälen besitzt.

Die σ -Pore in doppelmutierten tetrameren *hKv1.3_V388C*-Kanälen

Um den σ -Poren-Weg zu testen, habe ich in den tetrameren *hKv1.3_V388C*-mutierten Kanälen andere Mutationen eingeführt, und zwar habe ich die Aminosäuren ersetzt, von denen ich vermutete, dass sie an der Bildung der Pore beteiligt sein könnten. Dabei habe ich die Aminosäuren mit kleinen Seitenketten durch solche mit größeren Seitenketten ersetzt.

Wenn diese Aminosäuren Teil der σ -Pore sind, könnten diese Modifikationen den Stromfluss durch die σ -Pore stoppen.

Mutationen im σ -Porenweg

Die Detektion und Charakterisierung des σ -Stroms in trimeren *hKv1.3_V388C*-Kanälen hat die Existenz der σ -Pore endgültig festgestellt. Um weiter den σ -Porenweg zu erforschen, habe ich zusätzliche Mutationen in den tetrameren *hKv1.3_V388C*-Kanal eingeführt, um zu sehen, ob die zweite Mutation die σ -Pore schließen könnte.

Die Ströme durch die Kanäle mit den Doppelmutationen werden in Abb. 18 und 19 exemplarisch gezeigt. In Abb. 18 werden Ströme durch doppelmutierte *hKv1.3_V388C_M390F*-Kanäle gezeigt. Es ist in Abb. 18A deutlich zu erkennen, dass bei Potentialen von -200 bis -60 mV ein großer Einwärtsstrom in $[4,5 \text{ K}^+]_o$ fließt (schwarze Spur). Dieser Einwärtsstrom ist identisch mit dem σ -Strom durch die *hKv1.3_V388C*-Kanäle, wie in Abb. 4B gezeigt. Auch Abb. 18B zeigt, dass durch die doppelmutierten *hKv1.3_V388C_M390F*-Kanäle ein großer Einwärtsstrom nach der Depolarisation fließt (schwarze Spur), der durch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration viel kleiner wird (rote Spur). Diese Eigenschaft zeigte auch schon der Strom durch die *hKv1.3_V388C*-Kanäle (Abb. 6B/D). Ich schließe aus diesen Messungen, dass die σ -Pore in *hKv1.3_V388C_M390F*-Kanälen immer noch funktionstüchtig ist, obwohl das Methionin an Position 390 durch die größere Aminosäure Phenylalanin ersetzt wurde.

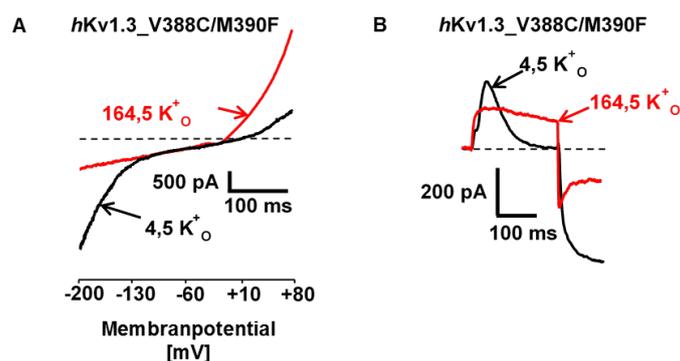


Abb. 18. Die doppel mutierten Kanäle *hKv1.3_V388C_M390F* können einen σ -Strom erzeugen. *A*, Rampenstrom durch die mutierten Kanäle in $[4,5 \text{ K}^+]_o$ (schwarze Spur) und $[164,5 \text{ K}^+]_o$ (rote Spur) externe

Badlösung. Die Ströme wurden ausgelöst wie in der Legende zu Abb. 4 beschrieben. *B*, die Ströme durch *hKv1.3_V388C_M390F* wurden ausgelöst wie in der Legende zu Abb. 6 beschrieben. Ich habe 11 Zellen bearbeitet und in 9 Zellen wurden die Ströme gemessen. Abb. aus Tyutyayev, P., Grissmer, S., 2018, Seite 1118 (Abb. 4 A+C).

Ganz im Gegensatz zur Doppelmutation *V388C_M390F*, die keinerlei Veränderung bezüglich der σ -Pore gegenüber der Einzelmutation *V388C* zeigte, verhielt sich der Strom durch die *hKv1.3_V388C_Y395W* doppelmutierten Kanäle. Die Ergebnisse meiner Messungen mit dieser Doppelmutante sind in Abb. 19 dargestellt. Es ist auf den ersten Blick zu erkennen, dass keine σ -Ströme zu messen sind. Sowohl die Ströme ausgelöst über Spannungsrampen (Abb. 19A) als auch über Spannungsschritte (Abb. 19B) ähneln eher den Strömen durch die *hKv1.3_wt*-Kanäle, die keine σ -Pore besitzen (Abb. 4A und 6A/C), als den Strömen durch *hKv1.3_V388C*-Kanäle. Ich schließe aus diesen Messungen, dass die σ -Pore in *hKv1.3_V388C_Y395W*-Kanälen nicht mehr funktionsfähig ist.

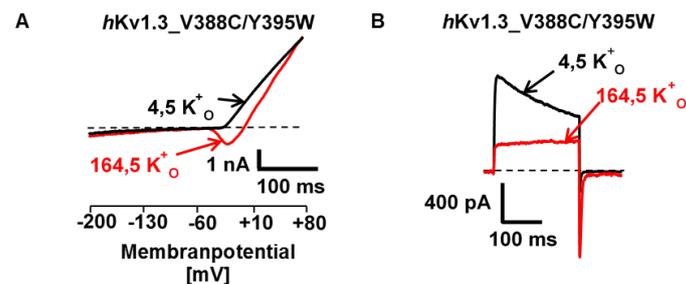


Abb. 19. Die doppelt mutierten Kanäle *hKv1.3_V388C_Y395W* können keinen σ -Strom erzeugen. *A*, Rampenstrom durch die mutierten Kanäle in $[4,5 \text{ K}^+]_o$ (schwarze Spur) und $[164,5 \text{ K}^+]_o$ (rote Spur) externe Badlösung. Die Ströme wurden ausgelöst wie in der Legende zu Abb. 4 beschrieben. *B*, die Ströme durch *hKv1.3_V388C_Y395W* wurden ausgelöst wie in der Legende zu Abb. 6 beschrieben. Ich habe 13 Zellen bearbeitet und in 10 Zellen wurden die Ströme gemessen. Abb. aus Tyutyayev, P., Grissmer, S., 2018, Seite 1118 (Abb. 4 B+D).

Tabelle 5 fasst die Ergebnisse dieser Experimente mit allen untersuchten Doppelmutanten zusammen. Alle Doppelmutanten mit Ausnahme des *hKv1.3_V388C/Y395W*- und des *hKv1.3_V388C/T392Y*-Kanals zeigten Ströme durch die σ -Pore, was darauf hinweist, dass

diese beiden Positionen (392 und 395) eventuell direkt die σ -Pore bilden. Der *hKv1.3V388C/W384F* zeigte wie erwartet keinen α -Strom, generierte aber einen σ -Strom.

Tab. 5. Die doppelt-mutierten Kanäle mit und ohne σ - und α -Pore. Tab. 2 aus Tyutyayev, P., Grissmer, S., 2018, Seite 1118.

Kanal	Substitution	α -pore	σ -pore
<i>hKv1.3V388C</i>	M390F	+	+
	A413F	+	+
	Y395W	+	-
	T392Y	+	-
	W384F	-	+
	V393L	+	+

Modell der σ -Pore

Mit dem Programm Caver wurde die σ -Pore modelliert. In Abb. 20 ist eine Übersicht des Modells des *hKv1.3_V388C*-Kanals (Tetramer) dargestellt. Dieses Modell ist einmal als Aufsicht von der extrazellulären Seite aus zu sehen (Abb. 20A) und einmal als Seitenansicht mit der extrazellulären Seite nach oben (Abb. 20B). Jede Untereinheit des Modells hat ihre eigene Farbe und es sind vom Kanal nur jeweils die Bereiche von S5 bis S6 dargestellt.

Im Zentrum befindet sich die α -Pore (ist orange dargestellt), die σ -Pore befindet sich unterhalb bzw. hinter der α -Pore (ist schwarz dargestellt). Ich modellierte die σ -Pore im *hKv1.3_V388C*-mutierten Kanal und nach dem Modell postuliere ich, dass der Eingang zur σ -Pore von außen zwischen Y395 (*Shaker*-Position 445) auf der Rückseite der zentralen α -Pore und W384 (*Shaker*-Position 434) des Kanals liegen sollte. Das Modell postulierte weiterhin, dass die zwischen S5-S6 gelegene σ -Pore und der Austausch von Valin mit zwei Methylgruppen den Raum zwischen Tyr-395 und Trp-384 auf der extrazellulären Seite erweitern könnte. Dadurch kann diese Mutation zur Bildung einer neuen Struktur führen. Nach der Modellierung und den Aminosäuren sind Y395 und T392 wahrscheinlich an der Bildung der σ -Pore beteiligt.

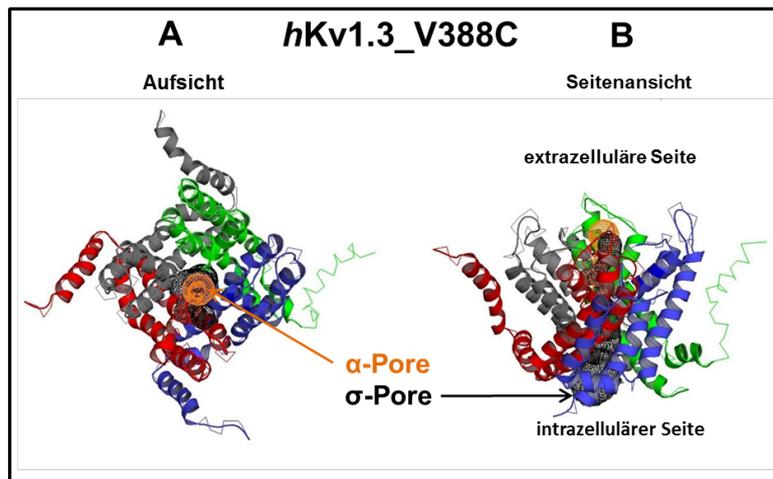


Abb. 20. A). Ansicht auf *hKv1.3_V388C* mit α - (orange) und σ -Poren (schwarz) von oben extrazellulär. B). Ansicht auf *hKv1.3_V388C* mit α - (orange) und σ -Poren (schwarz) von der Sagittalebene. Abb. aus Tyutyayev, P., Grissmer, S., 2018, Seite 1119 (Abb. 5 A).

Die experimentellen elektrophysiologischen Daten bestätigten die Annahme, dass die Substitution dieser Aminosäuren die σ -Pore blockieren kann. In der Abb. 21 werden die mutierten Aminosäuren in dem Modell gezeigt. Jede Reihe (A bis F) besteht aus dem Ausschnitt des Modells, in dem links die unmutierte Aminosäure mit ihrer Umgebung und rechts die mutierte Aminosäure in derselben Umgebung dargestellt ist. Der Blickwinkel in den Abbildungen rechts und links ist gleich.

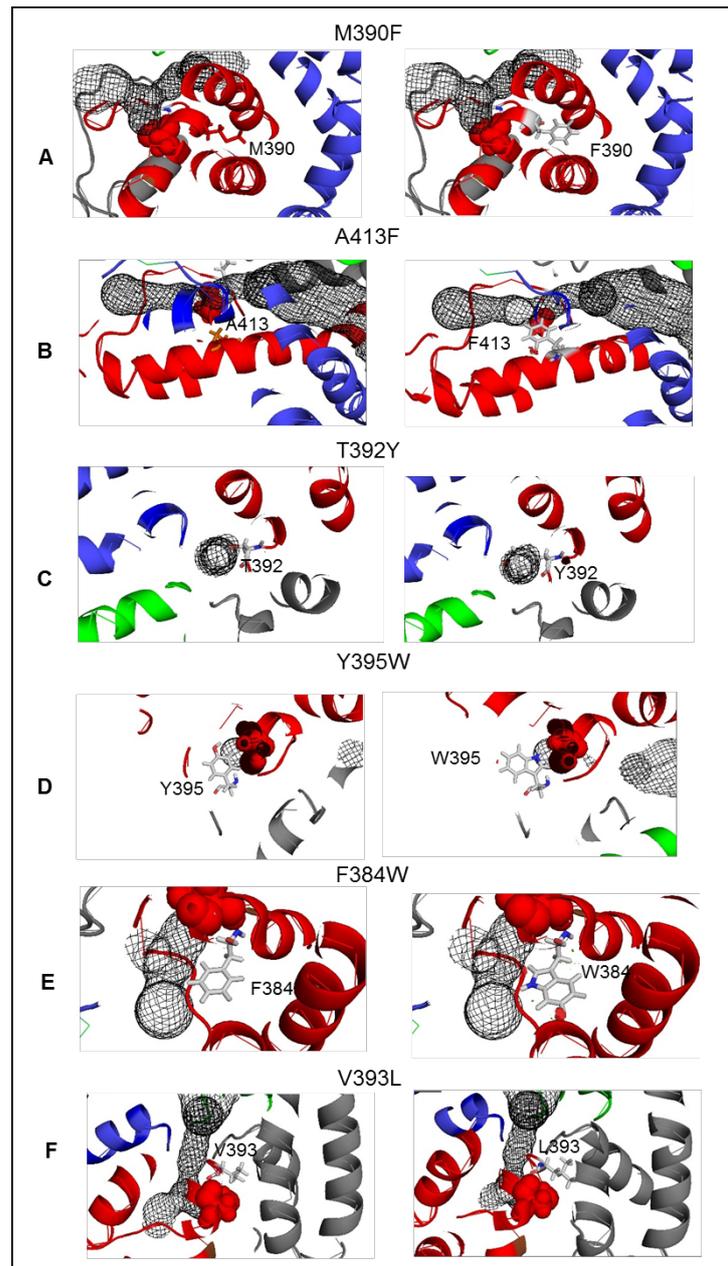


Abb. 21. Regionspezifische Vergrößerungen der mutierten Aminosäuren und der σ -Pore im tetrameren *hKv1.3_V388C*-Kanal. Die σ -Pore ist schwarz dargestellt. Abb. aus Tyutyayev, P., Grissmer, S., 2018, Seite 1120 (Abb. 6).

4 Diskussion

Für diese Arbeit habe ich eine Strategie gewählt, bei der ich zuerst die σ -Pore in einem anderen Kanal nachgewiesen habe und damit dieses Phänomen auf weitere Kaliumkanäle erweitert habe. Danach habe ich die neue σ -Pore in einem trimeren *hKv1.3_V388C*-Kanal nachgewiesen und abschließend wurde von mir die Pore durch Doppelmutanten im *hKv1.3_V388C*-Kanal detailliert charakterisiert.

4.1 Der trimere *hKv1.3_V388C*-Kanal

Miteinander verknüpfte Untereinheiten sind schon seit vielen Jahren ein Hilfsmittel für die Untersuchung der Ionenkanäle (Preisig-Müller et al., 2002; Wimmers et al., 2002; Sokolov et al., 2007). Es wurden Dimere und Trimere aus α -Untereinheiten diverser Kv-Kanäle kreiert (Sokolov et al., 2007) und dann in Zellen exprimiert, um zu sehen, welche Ströme generiert werden. Dabei wurde gezeigt, dass ein Dimer sich mit einem anderen Dimer zu einem funktionellen Tetramer verbinden konnte, genauso wie ein Trimer mit einem Monomer einen funktionsfähigen Kanal bilden konnte (Sokolov et al., 2007). Bisher wurde noch nicht gezeigt, dass ein Trimer alleine eine funktionsfähige α -Pore bilden kann. Daher gehe ich davon aus, dass auch der Trimer, den ich kreiert habe, keine α -Pore hat. Mein Trimer könnte allerdings eine σ -Pore besitzen, wenn die Geometrie im Trimer zwischen den Untereinheiten ähnlich ist wie im Tetramer. Dies vermute ich, weil der Linker zwischen den Untereinheiten klein ist und die restlichen Stellen im Protein durch EGFP belegt sind. EGFP hat zusätzlich eine Sequenz für den Transport zur Zellmembran. Diese Signalsequenz erleichtert den Transport des Fusionsproteins zur Zellmembran. Die Verknüpfung des Kanals mit EGFP hat meistens keinen Einfluss auf die Funktionalität des Kanals (Sokolov et al., 2007). Experimentell wurden meine Annahmen bestätigt, weil der trimere *hKv1.3_V388C*-Kanal den gleichen σ -Strom zeigte wie der entsprechende tetramere Kanal. Dies bedeutet auch, dass der σ -Strom im tetrameren Kanal tatsächlich durch die σ -Pore fließt und nicht durch die α -Pore.

Es ist außerdem wichtig, dass der geschaffene Trimer in den Zellen gut exprimiert wird. Mit der Dot-Blot-Analyse konnte ich nachweisen, dass der Trimer exprimiert wird und die Expression keine großen toxischen Effekte auf die Zellen hat. Somit sind die klonierten Vektoren (Trimer und neue tetramere Mutanten) funktionsfähig und ich konnte das

Fusionsprotein exprimieren. Im nächsten Schritt wurden Zelllinien auf Expression von endogenen Ionenkanälen getestet.

Da der σ -Strom ähnliche Eigenschaften wie ein Leckstrom hat, war es für mich wichtig, dass die Zellen für die Expression keinen oder, wenn doch, dann nur einen sehr kleinen endogenen Strom und Leckstrom hatten.

Im Dot Blot zeigte sich nur eine geringe Expression des trimeren Kanals. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass es zu einer sehr starken Expression des Fusionsproteins kommt, sodass das Ubiquitinylierungssystem und das Proteasom das überschüssige Fusionsprotein abbauen. Es kann also beim Trimer zu Problemen bei der Translation kommen. Oft bleiben die verknüpften Untereinheiten in großen Mengen intrazellulär und werden schlecht in die Membran transportiert (Zheng und Trudeau, 2016). Trotzdem konnte ich den σ -Strom bei der Expression des trimeren Kanals in den Zellen messen.

4.2 Modell der σ -Pore

Die aktuellen Studien der Alternativwege in Kaliumkanälen liefern wichtige Beiträge zu unserem Verständnis der Biochemie, der Biophysik und der Pharmakologie dieser Ionenkanäle. Mit Hilfe des σ -Poren-Modells kann man mehrere kritische Positionen im oberen Teil des Weges der σ -Pore voraussagen. Nach dem Modell habe ich einige Aminosäuren verändert, die die Existenz der σ -Pore beeinflussen könnten. Nach der Modellierung und der praktischen Überprüfung der Wirkung der Aminosäuren auf Position Y395 und T392 auf den σ -Strom habe ich geschlossen, dass diese zwei Positionen an der Bildung der σ -Pore beteiligt sind.

Meine Ergebnisse zeigen deutlich, dass die *hKv1.3_V388C*-Mutation (*Shaker*-Position 438), unabhängig davon, ob trimerer oder tetramerer Kanal, die σ -Pore öffnet. Der trimere Kanal beweist also, dass die σ -Pore überhaupt existiert und der Strom nicht durch die α -Pore fließt. Der σ -Strom durch *hKv1.2_V370C*-Kanäle zeigt, dass die σ -Pore nicht nur auf *hKv1.3* beschränkt ist, sondern ein gemeinsames Strukturelement einer Vielzahl von spannungsgesteuerten Ionenkanälen sein könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sowie die veröffentlichten Daten legen nahe, dass die Struktur der σ -Pore auch in anderen Kv-Kanälen vorkommt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen *Kv1.3*, *KcsA*, *KCNH2* und anderen Kv-Kanälen zeigt eine

gute Übereinstimmung speziell im Bereich S5-S6 einschließlich der kurzen Pore-Helix und des Selektivitätsfilters. Diese gute Übereinstimmung lässt eine große Ähnlichkeit der Kanalstrukturen in diesem Teil der Kanalpore erahnen und eröffnet die Möglichkeit, dass die σ -Pore auch in anderen Ionenkanälen existieren könnte.

Die Mutation V388 öffnet die σ -Pore

Die Position V388 im *hKv1.3*-Kanal, die im Zusammenhang mit der Entstehung der σ -Pore steht, wurde von Prütting und Kollegen 2011 beschrieben. Bei dieser Substitution wurden zwei Methylgruppen aus dem Benzolring (Position V388) entfernt und das führt zu einer Vergrößerung des Abstandes zwischen Tyr-395 und Trp-384 und ermöglicht jetzt den Durchtritt von Ionen. Die Autoren stellten fest, dass bei Potentialen negativer als -100 mV ein irregulärer Na^+ -Einwärtsstrom (σ -Strom) fließt, der weder durch die α -Pore noch durch die ω -Pore des *hKv1.3_V388C*-Kanals verläuft. Dieser neue alternative Weg wurde als σ -Pore bezeichnet. Bei den oben genannten Potentialen ist die α -Pore normalerweise geschlossen und leitet keine Ionen. Die σ -Pore wurde anschließend modelliert (Prütting et al., 2011) und nach diesem Modell befindet sich der Eingang der σ -Pore auf der Rückseite des Selektivitätsfilters der α -Pore. Weiter verläuft sie parallel zur α -Pore durch den Kanal. Sie passiert den Bereich der Bindungsstelle von Verapamil zwischen benachbarten S6-Untereinheiten und endet intrazellulär. Die α -Pore-blockierenden Substanzen wie extrazelluläres TEA und CTX können den σ -Strom nicht blockieren. Der σ -Strom ist durch Verapamil blockierbar.

Positionen 390 und 413 im tetrameren *hKv1.3_V388C*-Mutantenkanal stören nicht den σ -Porenstrom

Das in Abb. 20 und Abb. 21 gezeigte Modell kann demonstrieren, dass die Position 390 die σ -Pore nicht beeinflusst. Beide Reste, Methionin oder Phenylalanin (M390F), verlaufen parallel zur σ -Pore, haben aber keinen Kontakt mit der Pore. Von daher ist leicht zu verstehen, warum die in Tabelle 4 zusammengefassten elektrophysiologischen Daten zeigen, dass die Substitution M390F keinen Einfluss auf den σ -Strom durch den Mutantenkanal hat. Ähnlich ist es bei der Position 413, die sich gegenüber von C388 befindet. Diese Position hat keinen Kontakt mit der σ -Pore (Abb. 21), unabhängig davon, ob an dieser Position ein

Alanin oder ein Phenylalanin vorhanden ist. Das erklärt, warum ich den σ -Porenstrom durch den Mutationskanal *hKv1.3_V388C_A413F* messen konnte (Tab. 4).

Dass die Position 413 Einfluss auf den Strom durch die α -Pore hat, wurde von anderen Autoren schon gezeigt. Zum Beispiel verändert die homologe Mutation A413C im *Shaker*-Kanal die Affinität des Kanals zu K^+ zu intrazellulär-appliziertem Ba^{2+} (Ogielska et al., 1998) und beeinflusste damit auch die C-Typ-Inaktivierung (Ogielska et al., 1999). Auch wurde die Position 413 für die Bindung von Phenylalkylaminen als wichtigste Bindungsstelle ermittelt (Dreker und Grissmer, 2005).

Positionen 392 und 395 in tetrameren *hKv1.3_V388C*-mutierten Kanälen bilden die σ -Pore

Die Seitenkette des Threonins an Position 392 ragt etwas in den Verlauf der σ -Pore hinein (Abb. 21), allerdings nicht so weit, dass kein σ -Strom zu messen ist. Wenn allerdings die Seitenkette des Threonins durch die größere Seitenkette des Tyrosins ersetzt wird, dann befindet sich der große aromatische Phenylring des Tyrosins voll im σ -Porenweg und verhindert dadurch einen σ -Porenstrom.

Das Modell der σ -Pore in Abb. 21 zeigt auch, dass sich Y395 nicht in der σ -Pore befindet, aber durch den Benzolring Kontakt mit der Pore und auch mit dem Cystein auf der Position 388 hat. Die Mutation Y395W hatte einen Einfluss auf die σ -Pore, sie verhindert nämlich den Strom durch die σ -Pore im *hKv1.3_V388C_Y395W*-Kanal. Es scheint, als ob der Pyrrolring des Tryptophans an Position 395 näher an Position C388 ist, somit stärker mit dem Cystein in Wechselwirkung treten kann und damit zum Verschließen der σ -Pore führt. Dass die Positionen 392 und 395 im *Kv1.3*-Kanal für die Funktion der α -Pore von Bedeutung sind, wurde schon gezeigt. Position 392 im *Kv1.3*-Kanal und die homologe Position 442 im *Shaker*-Kanal sind Teil des inneren Vestibüls (Durell et al., 1996). Die T442S-Mutation im *Shaker*-Kanal destabilisierte den Inaktivierungszustand des Kanals (Yool et al., 1995) und hatte eine große Auswirkung auf die Kanalkinetik (Zheng et al., 1997).

Die Positionen 384 und 393 im tetrameren *hKv1.3_V388C*-Mutantenkanal sind von der σ -Pore weit entfernt

Die Position 384 ist weit von der σ -Pore entfernt und kommt nicht direkt in Kontakt mit der σ -Pore, wie in Abb. 21 zu sehen ist. Sogar die Vergrößerung der Seitenkette von Phenylalanin an Position 384 durch einen Pyrrolring zu Tryptophan (F384W) modifizierte den σ -Porenweg nicht (Abb. 21). Die Substitution W384F in Kaliumkanälen beziehungsweise im *Shaker*-Kanal (W434F) blockt komplett den Strom durch die α -Pore des Kanals (Yang et al., 1997). Ich habe auch keinen α -Strom durch *hKv1.3_W384F*-Kanäle gemessen. Allerdings war der σ -Porenstrom noch messbar (Tab. 4).

Position V393 wurde ausgewählt, weil sie sich in der Nähe von C388 befindet (Abb. 21). Ich mutierte Valin zu Leucin an dieser Position, um den Kontakt mit der Position C388 zu erhöhen. Diese Manipulation konnte jedoch das Cystein an Position 388 nicht beeinflussen und hatte deshalb auch keinen Einfluss auf den Strom durch die σ -Pore. Für die Position V393 in *Kv1.3* (V443 in *Shaker*) wurde gezeigt, dass hydrophobe Reste an der Position 443 des *Shaker*-Kanals als Barrieren für den Durchgang von Mg^{2+} durch die Pore wirken (Harris und Isacoff, 1996).

4.3 Der σ -Strom – mögliche Ursache von Krankheiten

Es wurde gezeigt, dass Mutationen im Poren-Bereich in verschiedenen Ionenkanälen mit vielen Krankheitsbildern assoziiert sind (Lehman-Horn et al., 1999; Singh et al., 2003). Viele dieser Mutationen könnten theoretisch – ähnlich wie die Mutation V388 in *hKv1.3*-Kanälen – alternative Wege durch die Kanäle öffnen. Zum Beispiel führt die Mutation N629D im HERG-Kaliumkanal zur Generierung eines Na^+ -Stromes durch den Kanal bei hyperpolarisierenden Potentialen. Dieser Strom kann auch von Cs^+ getragen werden und führt zu einer Depolarisation der Membran. Dadurch könnten Arrhythmien verursacht werden. Die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration *in vitro* führte zu einer Verringerung des Na^+ -Stromes und korrigierte *in vivo* die abnormale Repolarisation in EKG-Aufnahmen von Patienten mit LQT (Lees-Miller et al., 2000; Teng et al., 2004). Es besteht also durchaus die Möglichkeit, dass im Fall des N629D-mutierten HERG-Kaliumkanals durch die Mutation ein alternativer Weg im HERG-Kanal geöffnet wurde, ähnlich der σ -Pore im *hKv1.3*-Kanal.

Es gibt auch Mutationen in spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen, die in Zusammenhang mit Kopfschmerzen bei Migräne gebracht werden. Die Symptome des Schmerzes werden mit einer langen Depolarisationsphase in Verbindung gebracht (Kraus et al., 1998). Möglicherweise sind diese langen Depolarisationen ebenfalls mit einem Na^+ -Einwärtsstrom durch eine alternative Pore erklärbar.

5 Zusammenfassung

Der Strom durch die σ -Pore wurde erstmals in *hKv1.3_V388C*-Kanälen beschrieben, wo die V388C-Mutation eine neue σ -Pore hinter der zentralen α -Pore öffnete (Pruetting et al., JBC286: 2031-2042). Typisch für diesen mutierten Kanal war der Einwärtsstrom bei Potentialen, die negativer als -100 mV waren, wenn die zentrale α -Pore geschlossen war. Die α -Porenblocker wie TEA⁺ und Peptidtoxine (CTX, MTX) konnten den Strom durch die σ -Pore nicht reduzieren.

Um zu sehen, ob dieses Phänomen auf *hKv1.3*-Kanäle beschränkt ist, mutierte ich einen *hKv1.2*-Kanal an der homologen Position (*hKv1.2_V370C*). Für eine detailliertere Charakterisierung der σ -Pore haben wir einen Trimer geschaffen, der aus drei *hKv1.3_V388C* α -Untereinheiten besteht, die miteinander verknüpft sind. Um zu bestimmen, welche Aminosäuren die σ -Pore im *hKv1.3_V388C*-Kanal bilden, mutierte ich einzelne Aminosäuren im *hKv1.3_V388C*-Kanal, die an der σ -Porenbildung beteiligt sein könnten.

Das Ergebnis der vorliegenden Studie bestätigt und erweitert die früheren Ergebnisse, die zuerst beschrieben, dass die V388C-Mutation in *hKv1.3*-Kanälen zu einem Kanal mit zwei Ionenleitbahnen führte. Die früheren Ergebnisse ermittelten eine zentrale, kaliumselektive α -Pore und einen zweiten Weg, die σ -Pore, die bei negativen Membranpotentialen offen ist, und bei denen die α -Pore normalerweise geschlossen ist. Meine Experimente mit dem trimeren *hKv1.3_V388C*-Mutantenkanal zeigten, dass die σ -Pore unabhängig von der α -Pore war, und die ortsgerichtete Mutagenese identifizierte zwei Aminosäuren im Kanal, die die σ -Pore (Position 392 und 395) bilden.

Speziell habe ich Folgendes herausgefunden:

1. Die Mutation V370C in *hKv1.2_wt*-Kanälen ermöglichte einen σ -Strom bei Potentialen negativer als -60 mV. Der σ -Strom und die σ -Pore waren nicht durch CTX blockierbar. Der σ -Strom wurde nicht durch Protonen geleitet. Die Ionenselektivität der σ -Poren in den *hKv1.2_V370C* und *hKv1.3_V388C*-Kanälen war fast identisch.
2. Die σ -Pore existierte auch im Trimer *hKv1.3_V388C_EGFP* und hatte ähnliche Eigenschaften wie die σ -Pore in *hKv1.2_V370C*- und *hKv1.3_V388C*-Kanälen.
3. Die Doppelmutationen Y395W und T392Y blocken die σ -Pore im Hintergrund des *hKv1.3_V388C*-mutierten Kanals, blockierten die σ -Pore und verhinderten den σ -

Porenstrom, wohingegen die Doppelmutationen M390F, A413F, W384F und V393L im *hKv1.3_V388C*-Kanal den Stromfluss durch die σ -Pore nicht verhinderten.

Ich schließe aus meinen Ergebnisse, dass die σ -Pore ein Strukturelement sein kann, das in einer Vielzahl von spannungsgesteuerten Ionenkanälen vorkommt. Der σ -Strom könnte somit Initiator sein für weitere elektrophysiologische und pharmakologische Untersuchungen der Mutationen im Porenbereich, die mit Krankheiten assoziiert sind. Möglicherweise öffnen manche dieser Mutationen ebenfalls einen alternativen Weg durch das Kanalprotein, ähnlich der σ -Pore. Diese neue Erkenntnis über eine mögliche alternative Pore als Ursache für ein Krankheitsbild könnte neue Denkanstöße zur Aufklärung der Krankheitsursachen und -bekämpfung initiieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Al-Sabi A, Shamotienko O, Dhochartaigh SN, Muniyappa N, Le Berre M, Shaban H, Wang J, Sack JT, Dolly JO. (2010) Arrangement of Kv1 alpha subunits dictates sensitivity to tetraethylammonium. *J Gen Physiol.* 136: 273-282.
2. Armstrong CM, Bezanilla F. (1977) Inactivation of the sodium channel. Gating current experiments. *J Gen Physiol.* 70: 567-590.
3. Catterall WA. (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26: 13-25.
4. Dodson PD, Barker MC, Forsythe ID. (2002) Two heteromeric Kv1 potassium channels differentially regulate action potential firing. *J Neurosci.* 22: 6953-6961.
5. Dreker T, Grissmer S. (2005) Investigation of the phenylalkylamine binding site in *hKv1.3* (H399T), a mutant with a reduced C-type inactivated state. *Mol Pharmacol.* 68(4): 966-973.
6. Durell SR, Guy HR. (1996) Structural model of the outer vestibule and selectivity filter of the *Shaker* voltage-gated K⁺ channel. *Neuropharmacology* 35: 761-773.
7. Garcia-Calvo M, Leonard RJ, Novick J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ, Garcia ML. (1993) Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J Biol Chem.* 268: 1866-1874.
8. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA. (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28: 365-368.
9. Grissmer S, Cahalan M. (1989) TEA prevents inactivation while blocking open K⁺ channels in human T lymphocytes. *Biophys J.* 55: 203-206.

10. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391: 85-100.
11. Harris RE, Isacoff EY. (1996) Hydrophobic mutations alter the movement of Mg^{2+} in the pore of voltage-gated potassium channels. *Biophys J.* 71: 209-219.
12. Hille B: *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd Ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA. S. 131–143 (2001).
13. Jie Zheng, Matthew C. Trudeau *Handbook of Ion Channels*. CRC Press 2016
14. Kiss L, LoTurco J, Korn SJ. (1999) Contribution of the selectivity filter to inactivation in potassium channels. *Biophys J.* 76: 253-263.
15. Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K. (1999) Voltage-Gated Ion Channels and Hereditary Disease. *Physiol Rev.* 79: 1317–1372.
16. Ogielska EM, Aldrich RW. (1998) A mutation in S6 of *Shaker* potassium channels decreases the K^+ affinity of an ion binding site revealing ion-ion interactions in the pore. *J Gen Physiol.* 112: 243-257.
17. Ogielska EM, Aldrich RW. (1999) Functional consequences of a decreased potassium affinity in a potassium channel pore. Ion interactions and C-type inactivation. *J Gen Physiol.* 113: 347-358.
18. Pathak MM, Yarov-Yarovoy V, Agarwal G, Roux B, Barth P, Kohout S, Tombola F, Isacoff EY. (2007) Closing in on the resting state of the *Shaker* K^+ channel. *Neuron* 56: 124-140.

19. Preisig-Müller R, Schlichthörl G, Goerge T, Heinen S, Brüggemann A, Rajan S, Derst C, Veh RW, Daut J. (2002) Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 99: 7774-7779.
20. Pruetting S, Grissmer S. (2011) A novel current pathway parallel to the central pore in a mutant voltage-gated potassium channel. *J Biol Chem*. 286: 20031–20042.
21. Rasband MN, Trimmer JS. (2001) Subunit composition and novel localization of K⁺ channels in spinal cord. *J Comp Neurol*. 429(1): 166-176.
22. Rauer H, Grissmer S. (1999) The effect of deep pore mutations on the action of phenylalkylamines on the Kv1.3 potassium channel. *Br J Pharmacol*. 127: 1065-1074.
23. Robbins CA, Tempel BL. (2012) Kv1.1 and Kv1.2: similar channels, different seizure models. *Epilepsia* 1:134-41.
24. Singh NA, Westenskow P, Charlier C, Pappas C, Leslie J, Dillon J, Anderson VE, Sanguinetti MC, Leppert MF. (2003) KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain* 126: 2726-2737.
25. Sokolov S, Scheuer T, Catterall WA. (2005) Ion permeation through a voltage-sensitive gating pore in brain sodium channels having voltage sensor mutations. *Neuron* 47: 183–189.
26. Sokolov S, Scheuer T, Catterall WA. (2007) Gating pore current in an inherited ion channelopathy. *Nature* 446: 76–78.
27. Sokolov MV, Shamotienko O, Dhochartaigh SN, Sack JT, Dolly JO. (2007) Concatemers of brain Kv1 channel alpha subunits that give similar K⁺ currents yield pharmacologically distinguishable heteromers. *Neuropharmacology* 53: 272-282.

28. Soler-Llavina GJ, Chang TH, Swartz KJ. (2006) Functional interactions at the interface between voltage-sensing and pore domains in the *Shaker* Kv channel. *Neuron* 52: 623-634.
29. Starace DM, Bezanilla F. (2004) A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature* 427: 548-553.
30. Starkus JG, Kuschel L, Rayner MD, Heinemann SH. (1997) Ion conduction through C-type inactivated *Shaker* channels. *J Gen Physiol.* 110: 539-550.
31. Starkus JG, Kuschel L, Rayner MD, Heinemann SH. (1998) Macroscopic Na⁺ currents in the "Nonconducting" *Shaker* potassium channel mutant W434F. *J Gen Physiol.* 112: 85-93.
32. Teng GQ, Zhao X, Cross JC, Li P, Lees-Miller JP, Guo J. (2004) Prolonged repolarization and triggered activity induced by adenoviral expression of HERG N629D in cardiomyocytes derived from stem cells. *Cardiovascular Res.* 61: 268–277.
33. Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY. (2005) How far will you go to sense voltage ? *Neuron* 48: 719–725.
34. Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY. (2006) How does voltage open an ion channel ? *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22: 23–52.
35. Tombola F, Pathak MM, Gorostiza P, Isacoff EY. (2007) The twisted ion-permeation pathway of a resting voltage-sensing domain. *Nature* 445: 546–549.
36. Tyutyayev P, Grissmer S. (2017) Observation of σ -pore currents in mutant *hKv1.2_V370C* potassium channels. *PLOS one.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176078>

37. Tyutyayev P, Grissmer S. (2018) Characterization of the σ -pore in mutant hKv1.3 potassium channels. *Cell Physiol Biochem* 2018;46:1112–1121..
38. Vennekamp J, Wulff H, Beeton C, Calabresi PA, Grissmer S, Hänsel W. (2004) Kv1.3-blocking 5-phenylalkoxypsoralens: a new class of immunomodulators. *Mol Pharmacol.* 65:1364-1374.
39. Werkman TR, Gustafson TA, Rogowski RS, Blaustein MP, Rogawski MA. (1993) Tityustoxin-K alpha, a structurally novel and highly potent K⁺ channel peptide toxin, interacts with the alpha-dendrotoxin binding site on the cloned Kv1.2 K⁺ channel. *Mol Pharmacol.* 44: 430-436.
40. Wimmers S, Bauer CK, Schwarz JR. (2002) Biophysical properties of heteromultimeric *erg* K⁺ channels. *Pflugers Arch.* 445: 423-430.
41. Yang Y, Yan Y, Sigworth FJ. (1997) How does the W434F mutation block current in *Shaker* potassium channels? *J Gen Physiol.* 109: 779-789.
42. Yellen G. (1998) Premonitions of ion channel gating. *Nat Struct Biol.* 5: 421.
43. Yool AJ, Schwarz TL. (1995) Interactions of the H5 pore region and hydroxylamine with N- type inactivation in the *Shaker* K⁺ channel. *Biophys J.* 68: 448-458.
44. Zheng J, Sigworth FJ. (1997) Selectivity changes during activation of mutant *Shaker* potassium channels. *J Gen Physiol.* 110: 101-117.

Danksagung

Mein Dank gilt Professor Dr. S. Grissmer für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, die freundliche Unterstützung und die hilfreichen Anregungen bei den Korrekturen meiner Arbeit.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.