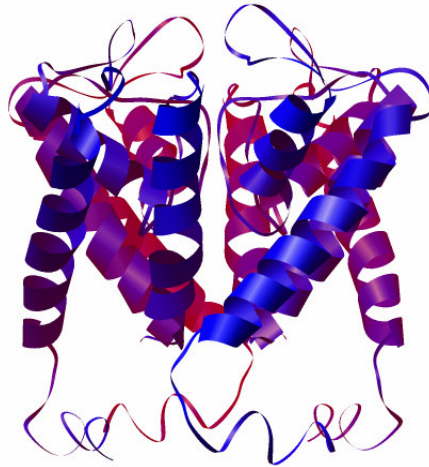


**Struktur-Funktions-Beziehung**  
**in dem minimalen viralen K<sup>+</sup>-Kanal Kcv:**

Funktionelle Rolle des N-Terminus  
bei der Regulation von Kanalaktivität



Von dem Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines *Doctor rerum naturalium*  
genehmigte Dissertation von

**Brigitte Hertel**

aus Darmstadt

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Paul Layer

Tag der Einreichung: 3. Mai 2005

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Juli 2005

Darmstadt 2005

D17

*Du kannst den Wind nicht ändern,  
aber die Segel anders setzen.*

Oscar Wilde

Abbildung Titelseite: Homologiemodell von dem viralen Kaliumkanal Kcv. Mit freundlicher Genehmigung von Dipl.-Biol. Sascha Tayefeh und PD Dr. Stefan M. Kast (TU Darmstadt, Physikalische Chemie I)

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Entstehen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

**Herrn Prof. Dr. Gerhard Thiel** für ein immer spannender werdendes Thema, die ständige Hilfsbereitschaft auftretende Fragen zu diskutieren, Probleme zu lösen auch wenn sie mal nicht wissenschaftlicher Natur waren und ganz besonders der freundschaftlichen und lockeren Art die entscheidend für das Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

**Herrn Prof. Dr. Paul Layer** herzlichst für die Übernahme des Koreferates.

**Karl Schuller und der Bande aus der Werkstatt** für die Hilfsbereitschaft bei den unterschiedlichsten Bauvorhaben und elektrischen Problemen. Besonders Karl für das jährliche Tennismatch.

**Stefan Kast und Sascha Tayefeh**, die mit schönen Bildern und Anregungen zur Verschönerung dieser Arbeit beigetragen haben.

**Der Gruppe aus Mailand** für die äußerst freundschaftliche Aufnahme in ihr Labor. Besonderer Dank geht hierbei an Anna, Giulio, Sabrina und Svetlana für die flexible Bereitstellung von unterschiedlichen Schlafplätzen und der schönen Zeit außerhalb des Labors.

**Barbara Reinhardt**, der Korrekturfée, die in sekundenschnelle alle restlichen Komma- und Rechtschreibfehler beseitigt hat.

**Allen Mitarbeitern und Ex-Mitarbeitern der AG Thiel** für die wunderschöne Zeit, für Pausen, Kaffee, nette Gespräche, Feierabend-Bierchen, für die ständige Bereitschaft zu fachlichen und auch weniger fachlichen Diskussionen und Anregungen.

Besonderer Dank geht hierbei an:

**Gisela**, unserer Laborfée, für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag und die aufheitrenden Gespräche, die wir miteinander geführt haben.

**Annette** für die Hilfe bei methodischen Fragen besonders bei molekularbiologischen Dingen, dem Korrekturlesen des Material- und Methodenteils und die gemeinsamen Runden im Pool.

**Ulrike** für die Klärung manch einer elektrophysiologischen Frage.

**Astrid** für die eine oder andere Information auch nicht wissenschaftlicher Natur und besonders für die „Freitagsleberwurst“

**Tobi** für die ständige Hilfsbereitschaft bei Computerproblemen und für nette Gespräche weit weg von diesen Problemen.

**Der Kcv-Gruppe** für die vielen fruchtbaren Diskussionen, dafür, dass sie immer da waren wenn ich sie brauchte und für den Spaß, den wir zusammen immer wieder hatten. **Cinzia** für die Versorgung mit italienischen Köstlichkeiten (Tiramisu) und Neuigkeiten aus der Welt des Kcv-Proteins. **Jörg** für die gemeinsame Zeit bei der Bearbeitung unterschiedlicher Projekte (Ich sag nur „Hefe“). **Henrik** für die treue Begleitung in der AG Thiel von Beginn an und für die eine oder andere auch mal etwas länger dauernde Diskussion. **Mario** für das ständige Interesse an meiner Arbeit auch nach seiner Zeit an der UNI, für die gemeinsamen Runden um die Fischerteiche und besonders für die gemeinsame *ver-patchte* Zeit.

**Allen Freunden/innen** außerhalb der UNI, die mir in schwierigen Zeiten immer zugehört, mich aufgemuntert und das eine oder andere Mal von der Arbeit abgehalten haben.

**Meiner Schwester Monika**, die in guten wie in schlechten Zeiten immer ein Ohr für mich hatte.

**Meinen Eltern**, die mir in meinem Leben immer freien Lauf gelassen haben und somit immer an mich geglaubt haben.

Mein größter Dank geht an **meinen Mann Dieter**, der mir in all den Jahren und besonders in der Endphase den Rücken freigehalten hat und mich bei allem bestärkt und unterstützt hat.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1.1	Kaliumkanäle: Struktur und Funktion .....	3
1.2	Gating von Kaliumkanälen .....	6
1.2.1	Das <i>Gate</i> .....	6
1.2.2	<i>Gating</i> -Mechanismen.....	7
1.3	Struktur und Funktion N-terminaler Domänen von K <sup>+</sup> -Kanälen.....	12
1.4	Lipid-Protein-Interaktionen .....	13
1.5	Der Kaliumkanal Kcv .....	15
1.5.1	Kcv – ein viraler Kaliumkanal.....	15
1.5.2	Kcv - Struktur-Funktionsanalysen .....	16
1.6	Zielsetzung.....	20
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1	Chemikalien .....	21
2.2	Enzyme .....	21
2.3	Größenstandards .....	21
2.4	Reaktionssysteme (Kits) .....	21
2.5	Oligonukleotide .....	21
2.6	Antikörper.....	21
2.7	Plasmide.....	22
2.8	Heterologe Expressionssysteme .....	23
2.9	Sterilisation von Lösungen und Arbeitsgeräten.....	23
2.10	Molekularbiologische Methoden .....	23
2.10.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	23
2.10.2	Ligation von DNA-Fragmenten.....	25
2.10.3	Kultivierung von <i>E.coli</i> .....	25
2.10.4	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	26
2.10.5	Plasmidpräparationen.....	26
2.10.6	Quantifizierung der Plasmid-DNA und der cRNA.....	26
2.10.7	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	27
2.10.8	Agarose-Gelelektrophorese .....	27
2.10.9	DNA-Sequenzierung.....	27
2.10.10	Zellkulturführung.....	27
2.10.11	Expression von Kcv und Kcv-Mutanten in HEK293-Zellen.....	28
2.10.12	Expression von Kcv und Kcv-Mutanten in <i>Xenopus</i> Oocyten .....	28
2.11	Proteinbiochemische Methoden.....	28
2.11.1	Homogenisierung der HEK293-Zellen.....	28
2.11.2	Proteinbestimmung .....	29
2.11.3	TCA-Fällung.....	29
2.11.4	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	29
2.11.5	Western-Blot-Analyse und Immunofärbung.....	29

2.12	Confokalmikroskopie.....	30
2.13	Elektrophysiologie.....	31
2.13.1	Elektrophysiologie an HEK293-Zellen.....	31
2.13.2	Elektrophysiologie an <i>Xenopus</i> Oocyten.....	31
2.14	Software, Internetadressen und GenBank Nummern.....	32
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1	Heterologe Expression von Kcv in HEK293-Zellen.....	33
3.2	Der N-Terminus ist essentiell für die Funktion des Kanals .....	37
3.2.1	Nachweis der $\Delta$ N11-Kcv-Mutante durch Western-Blot-Analyse.....	38
3.2.2	Zelluläre Verteilung der $\Delta$ N11-Kcv-Mutante in HEK293-Zellen .....	40
3.3	Die ersten 7 Aminosäuren sind nicht essentiell für die Funktionalität von Kcv.....	41
3.4	Austausch der ersten Aminosäure in der $\Delta$ N7-Kcv-Mutante.....	44
3.5	Position und Struktur der N-terminalen Domäne von Kcv.....	46
3.6	Austausch der Aminosäure Prolin an Position 13 im Kcv-Protein.....	48
3.6.1	Austausch von Prolin an Position 13 gegen ungeladene Aminosäuren .....	48
3.6.2	Austausch von Prolin an Position 13 gegen geladene Aminosäuren .....	53
3.7	Position von Prolin im Kcv-Protein.....	54
3.7.1	Wiedereinfügen von Prolin in die Kcv-P13D-Mutante .....	54
3.7.2	Wiedereinfügen von Prolin in die Kcv-P13A-Mutante .....	55
3.8	Verlängerung der ersten Transmembrandomäne im Kcv-Protein .....	57
3.9	Kcv in unterschiedlichen Expressionssystemen .....	59
3.9.1	Untersuchung der Mutanten in <i>Xenopus</i> Oocyten .....	60
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>67</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>81</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>82</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>90</b>	
A	Abkürzungen.....	90
B	Aminosäuren, Ein- und Dreibuchstabencode.....	91
C	Oligonukleotide.....	91

# 1. Einleitung

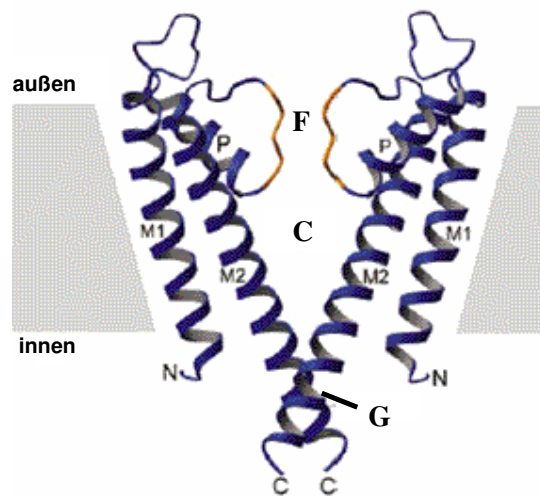
## 1.1 Kaliumkanäle: Struktur und Funktion

Kanalproteine bilden wassergefüllte Poren, welche die Lipid-Doppelschicht von biologischen Membranen durchspannen. Sie ermöglichen Ionen von geeigneter Größe entsprechend ihrem elektrochemischen Gradienten den raschen Membrandurchgang. Weit verbreitet sind Ionenkanäle, die eine relativ hohe Selektivität für Kalium gegenüber anderen Kationen besitzen. Der Transport durch Kaliumkanäle erfolgt mit einer Rate, die beinahe die diffusionslimitierte Geschwindigkeit im Wasser erreicht (Hille, 2001). Kaliumkanäle existieren vermutlich in allen Lebensformen und sind an wichtigen Zellfunktionen wie Regulation des Membranpotentials, Signaltransduktion und Osmoregulation beteiligt (Hille, 2001).

Ein funktioneller  $K^+$ -Kanal wird von vier Untereinheiten gebildet. Die Untereinheiten sind symmetrisch um die wassergefüllte Pore angeordnet (MacKinnon *et al.*, 2001). Allen  $K^+$ -Kanal-Untereinheiten gemeinsam ist ein struktureller Kern aus 2 transmembranen Helices (TM, M oder S), verbunden durch eine Aminosäuresequenz, die die Porendomäne (auch P-Loop, P-Schleife oder H5) bildet (Abb. 1). Die vier P-Schleifen der vier Untereinheiten bilden in der Pore einen Ring. Durch die Porengröße und durch Strukturen in der Pore, die sehr spezifische Wechselwirkungen mit den unterschiedlichen Ionensorten eingehen, wird die Ionen-selektivität der Kanäle erreicht. Damit funktioniert der P-Loop als Selektivitätsfilter (Miller, 1992; Jan und Jan, 1992). Der Bereich der P-Schleife der den Selektivitätsfilter bildet besitzt eine hoch konservierte Abfolge aus 8 Aminosäuren. Dieses Aminosäure-Motiv –**TXXTXGY/FG**– findet man in allen bisher klonierten  $K^+$ -Kanälen sowohl aus Eukaryonten, Prokaryonten als auch aus bestimmten Viren. Das Motiv wird als „*signature sequence*“ bezeichnet (Heginbotham *et al.*, 1994).

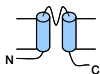
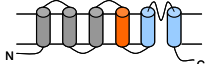
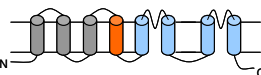
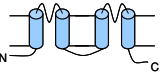

Im einfachsten Fall hat das Protein also den Aufbau TM1-P-TM2. Diese Architektur haben z.B. die eukaryontischen  $K_{ir}$ -Kanäle (*inward rectifier*) und die bakteriellen Kaliumkanäle KcsA aus *Streptomyces lividans* (Abb. 1) und KirBac1.1 aus *Burkholderia pseudomallei*. Weit verbreitet sind die Kv-Kanäle (*voltage gated*) mit vier zusätzlichen Transmembrandomänen (6TM-Motiv). Bei diesem Kanalmotiv befindet sich der P-Loop zwischen den Domänen S5 und S6. Zu diesem Strukturtyp gehören z.B. die tierischen Kanäle der *Shaker*-Gen Familie, die *Ether-à-Gogo* (EAG) Kanäle (Kubo *et al.*, 1992) und die ersten Kanäle die in Pflanzen identifiziert wurden. Es waren die beiden Kaliumkanäle aus *Arabidopsis thaliana*, AKT1 (*Arabidopsis K<sup>+</sup> transporter 1*) und KAT1 (*Kalium Arabidopsis thaliana channel 1*). Neben dem Porenloop besitzen die Kaliumkanäle vom 6TM-Motiv eine weitere markante Funktionseinheit, den Spannungssensor (S4-Helix). Die S4-Helix trägt mehrere positiv geladene Aminosäuren (Arg und Lys) und spielt somit eine Rolle in der Spannungsabhängigkeit des Ionentransports (Liman *et al.*, 1991). Die Änderung des Membranpotentials führt zu einer

Bewegung dieses Proteinabschnitts und dadurch zum Öffnen oder Schließen der Pore. Eine weitere Unterfamilie bilden die sogenannten Tandem-Kanäle mit zwei Porendomänen. Im Cetk1.3-Kanal (*Caenorhabditis elegans*) ist das 2TM-Motiv verdoppelt (Goldstein *et al.*, 1996). Bei Tok1 (*Saccharomyces cerevisiae*) ist ein 6TM-Motiv mit einem 2TM-Motiv verknüpft (Ketchum *et al.*, 1995). K<sup>+</sup>-Kanäle werden, je nach der Anzahl ihrer transmembranen Helices je Untereinheit, in unterschiedliche Familien eingeteilt (Tab. 1).



**Abb. 1: Struktur von dem bakteriellen Kaliumkanal KcsA.** (A) Zwei von vier Proteinuntereinheiten sind in der Seitenansicht gezeigt. Helices (M1 und M2) sind als Band dargestellt. Drei wichtige funktionelle Bereiche des Kaliumkanals sind dargestellt: die Filterregion (F), die Kavität (cavity, C) und das Tor (Gate, G) (nach Jiang *et al.*, 2002a).

Mit KcsA ist es erstmalig gelungen, ein Kaliumkanalprotein zu kristallisieren (Doyle *et al.*, 1998). Die Röntgenstrukturanalyse dieses einfach gebauten Kanals mit zwei Transmembrandomänen (Abb. 1) hat viel dazu beigetragen, die Kaliumselektivität auf molekularer Basis zu verstehen. Es folgten weitere Röntgenstrukturanalysen, wie die von den bakteriellen K<sup>+</sup>-Kanälen KirBac1.1 aus *Burkholderia pseudomallei* (Kuo *et al.*, 2003) und MthK aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Jiang *et al.*, 2002b). Analysen der Kristallstrukturen der bakteriellen Kaliumkanalproteine KcsA, KirBac1.1 und MthK lieferten Einblicke in den als *Gating* bezeichneten Mechanismus, der für das Öffnen und Schließen der Ionenkanäle verantwortlich ist (Doyle *et al.*, 1998; Morais-Cabral *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2002a, 2002b, 2003b; Kuo *et al.*, 2003).

Kaliumkanal	Beispiel	Organismus	
<b>2TM-Typ</b>			
			
Kir (inward rectifier)	KirBac1.1 Kir6.2	<i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Homo sapiens</i>	
Kanalhomologe aus Prokaryoten	KcsA MthK	<i>Streptomyces lividans</i> <i>M. thermoautotrophicum</i>	
Kanalhomologe aus Algenviren	Kcv Kesv	Chlorellavirus PBCV-1 Ectocarpusvirus EsV-1	
<b>6TM-Typ</b>			
			
Kv (Shaker-Typ)	Shaker (Kv1)	<i>Drosophila melanogaster</i>	
EAG (ether-à-gogo)	EAG hERG	<i>Caenorhabditis elegans</i> <i>H. sapiens</i>	
Slo (BK-Kanäle)	mSlo	<i>H. sapiens</i>	
HCN (Hyperpolarisations-aktivierte, Cyclo-Nucleotid-gesteuerte Kanäle)	HCN2	<i>H. sapiens</i>	
pflanzliche K <sup>+</sup> -Kanäle	KAT1 AKT1	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>A. thaliana</i>	
<b>Tandem-Kanäle</b>			
6TM-Motiv + 2TM-Motiv		Tok1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2x 2TM-Motiv		Cetk1	<i>C. elegans</i>
<b>Virale Ionenkanäle</b>			
(1TM)		M2 Vpu	Influenzavirus A HIV-1

Tab. 1: Übersicht der Strukturtypen und Kanalfamilien

## 1.2 Gating von Kaliumkanälen

Die funktionellen Eigenschaften von Kaliumkanälen basieren auf 2 fundamentalen Prozessen: Permeation und *Gating*. Die Permeation ist für den selektiven und effizienten Transport von Kaliumionen über die Membran verantwortlich. Das *Gating* hingegen kontrolliert den Eintritt von Ionen über den Permeationsweg. Es gibt zwei funktionelle Zustände, offen und geschlossen, die das Kanalverhalten beherrschen (Neher und Sakmann, 1976). Im offenen Zustand ist die Ionenpermeation effizient, wohingegen im geschlossenen Zustand kein Ionenfluss stattfindet. Es ist bekannt, dass  $K^+$ -Kanäle beim Wechsel von einem geschlossenen in einen offenen Zustand eine Konformationsänderung durchmachen. Der exakte Mechanismus und die strukturelle Basis für dieses Phänomen sind noch nicht ganz verstanden. Die Struktur, die direkt verantwortlich ist für das Öffnen des Kanals, wird als *Gate* bezeichnet.

### 1.2.1 Das Gate

Über die Lage des *Gates*, der den Permeationsweg öffnet und schließt, gibt es bisher 2 Hypothesen. Die vorherrschende Hypothese basiert auf dem Vergleich der Kristallstrukturen der beiden bakteriellen Kanäle; KcsA im geschlossenen und MthK im offenen Zustand. Diese Hypothese assoziiert das *Gate* mit einer cytoplasmatischen Engstelle, die durch das Überkreuzen der zweiten Transmembrandomänen (TM2) im tetrameren Protein erzeugt wird (Abb. 1).

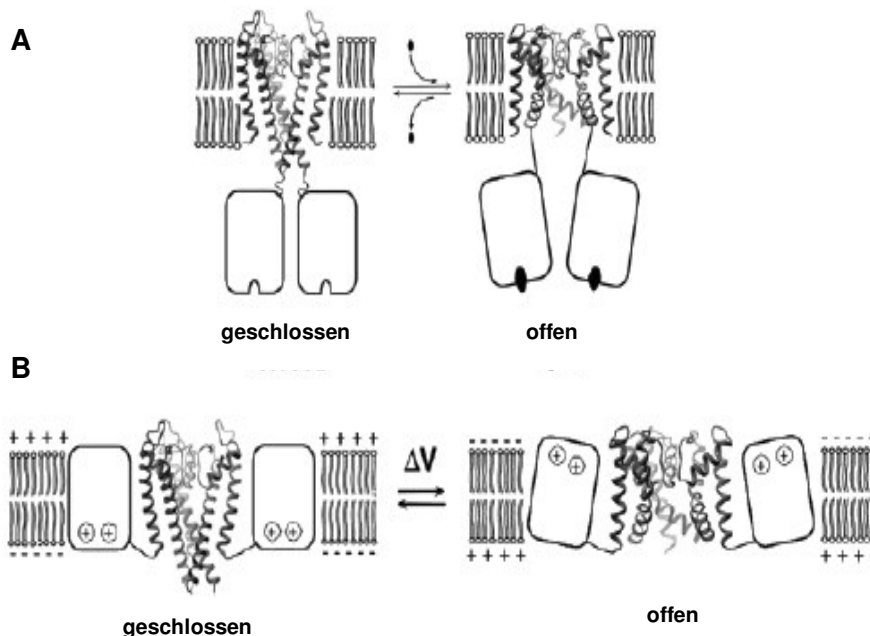
EPR-Spektroskopie (*electron paramagnetic resonance spectroscopy*) (Perozo *et al.*, 1999, 1998; Liu *et al.*, 2001) und Simulationsstudien (Shrivastava und Sansom, 2002; Biggin und Sansom, 2002) an dem bakteriellen Kanal KcsA weisen darauf hin, dass relativ kleine Verschiebungen der TM2-Helices an der intrazellulären Seite, den Kanal in eine funktionell offene Konformation umschalten können. Während der pH-abhängigen Aktivierung des KcsA-Kanals kommt es zu einer Rotationsbewegung der TM2-Helices und dadurch zu einer Vergrößerung des Durchmessers des inneren Vorraums (Perozo *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kanalöffnung mit der Erweiterung des inneren Vorraums des Kanals assoziiert ist. Auch Arbeiten an dem bakteriellen Kanal MthK, der im offenen Zustand kristallisiert wurde, unterstützen die Hypothese eines intrazellulären *Gate* am Kreuzungspunkt der TM2 Helices (Jiang *et al.*, 2002a).

Zusätzlich zu dem intrazellulären *Gate* am Kreuzungspunkt der Inneren Helices wird ein *Gate* im Selektivitätsfilter diskutiert. Dieser wird durch verschiedenste Experimente und theoretische Studien gestützt (Bichet *et al.*, 2003; Domene *et al.*, 2004; VanDongen, 2004). In diesen Arbeiten zeigte ich, dass die gleiche Struktur, nämlich der Selektivitätsfilter, Permeation und *Gating* kontrolliert. Molekulare Dynamik (MD) Simulationen von KirBac1.1 zeigen wie wichtig die Flexibilität des Filters für die Ionenpermeation ist (Domene *et al.*, 2004). Diese

Hypothese wird durch zusätzliche Experimente gestützt, die zeigen, dass Punktmutationen im Selektivitätsfilter einen beträchtlichen Effekt auf die Stabilität des Offenzustandes haben (Zheng und Sigworth, 1997; Chapman *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2001). Der Selektivitätsfilter scheint somit nicht nur an der Kaliumselektivität des Kanals beteiligt zu sein, sondern funktioniert wahrscheinlich auch als ein universelles *Gate*, der den Kanal öffnet und schließt. Unterstützung für ein *Gate* im Selektivitätsfilter kommt auch von Arbeiten an dem viralen Kaliumkanal Kcv. Dieser minimale Kanal und seine Homologen weisen *Gating*-Phänomene auf, obwohl die zweite Transmembrandomäne (TM2) zu kurz ist, um ein Überkreuzen zu erlauben (Gazzarrini *et al.*, 2004, Kang *et al.*, 2004b).

### 1.2.2 *Gating*-Mechanismen

Die Kontrolle des *Gates* von Kaliumkanälen ist von großer Wichtigkeit für viele physiologische Prozesse; dazu gehören so wichtige Funktionen wie die Kontrolle des Herzschrittes oder die Dauer bzw. Feuerrate von Aktionspotentialen. Das *Gating* und somit das Öffnen und Schließen von Kaliumkanälen kann physikalisch (z.B. durch mechanische Belastung, Änderungen in der Membranspannung) oder biochemisch (z.B. durch Bindung eines Liganden, pH-Wert Änderungen, Phosphorylierung,  $\text{Ca}^{2+}$  und anderes) geregelt sein (Hille, 2001). Die unterschiedliche Natur der Signale impliziert, dass es verschiedene *Gating*-Mechanismen gibt, die zum Öffnen und Schließen von  $\text{K}^+$ -Kanälen führen. Viele dieser Mechanismen greifen weit entfernt vom eigentlichen *Gate* an. Jedoch müssen alle *Gating*-Mechanismen entweder direkt oder indirekt mit dem *Gate* gekoppelt sein. Die meisten Mechanismen gehen mit einem Konformationswechsel einher, der durch Änderungen des Membranpotentials oder durch Ligandenbindung ausgelöst werden kann (Abb. 2). Im Folgenden werden die am besten charakterisierten *Gating*-Mechanismen beschrieben.



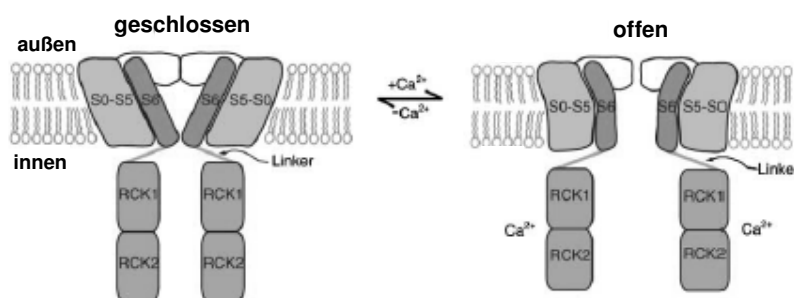
**Abb. 2: Gating-Mechanismen.** (A) Ein Ligand (●) bindet an eine Rezeptordomäne und induziert dadurch einen Konformationswechsel, der zu einem Öffnen des Kanals führt. Der Liganden-Rezeptor ist in diesem Fall auf der intrazellulären Seite lokalisiert. (B) Eine Spannungsänderung ( $\Delta V$ ) führt zu einem Konformationswechsel und zum Öffnen des Gates (nach Magidovich und Yifrach *et al.*, 2004).

*Gating*-Mechanismen von Kaliumkanälen unterliegen oft einer regulatorischen Kontrolle über Ligandenbindung, Proteinphosphorylierung oder direkter Interaktion mit cytosolischen Proteinen (Hattan *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2003). Die Bindestelle für Liganden oder regulatorische Proteine und auch Phosphorylierungsstellen sind meist an den cytoplasmatischen Regionen am N- und/oder C-Terminus des Kanalproteins lokalisiert (Abb. 2A). Der Mechanismus wie diese Interaktionen mit den cytoplasmatischen Bereichen auf das *Gate* übertragen werden und somit zu einer Modifizierung des Kanals führen, ist größtenteils unverstanden. Es wird diskutiert, dass Konformationswechsel in den cytoplasmatischen Domänen mechanisch, über Kopplungselemente, zum *Gate* übertragen werden und infolgedessen Auswirkungen auf das Kanal-*Gating* haben (Yi *et al.*, 2001; Minor *et al.*, 2000).

Ein Modell für ligandenabhängiges-*Gating* beruht auf Arbeiten, die auf der Kristallstruktur des bakteriellen  $K^+$ -Kanals MthK aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* basieren (Jiang *et al.*, 2002a, 2002b). Dieser Kanal öffnet durch cytoplasmatisches  $Ca^{2+}$ . Die Struktur von MthK in Anwesenheit von  $Ca^{2+}$  zeigt eine offene Pore und eine große cytoplasmatische Struktur, die von 8 C-terminalen RCK-Domänen (*regulator of  $K^+$  conductance*) gebildet wird. Jiang *et al.* postuliert, dass die RCK-Domänen als *Gating*-Ring funktionieren. Durch Bindung von  $Ca^{2+}$  ändert sich der Durchmesser dieses *Gating*-Rings, die inneren Helices bewegen sich

auseinander und es kommt zu einem Öffnen des Kanals. Die Änderung des Ring-Durchmessers ist in der gleichen Größenordnung wie der strukturelle Unterschied, der zwischen den inneren Helices von MthK (offener Kanal) und KcsA (geschlossener Kanal) festgestellt wurde (Jiang *et al.*, 2002b).

Auch Arbeiten an den Spannungs- und Calcium-aktivierten BK-Kanälen (*Large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels*) zeigen, dass die Bindung von Ca<sup>2+</sup> zu einer Aufweitung des C-terminalen *Gating-Rings* führt (Abb. 3). Es kommt zu einem Zug an den S6-RCK1-Linkern, die das *Gate* mit dem *Gating-Ring* verbinden, und dadurch zum Öffnen des *Gates* (Magleby, 2003; Niu *et al.*, 2004). Unabhängig davon, nämlich über den Spannungssensor in der S4-Domäne, führen auch Spannungsänderungen in BK-Kanälen zu einem Öffnen des *Gates* (Magleby, 2003). Niu *et al.* zeigte, dass eine Änderung des Linkers (S6-RCK1-Linker) zwischen dem cytoplasmatischen Ende der Inneren Helix und der ersten putativen RCK-Domäne Auswirkungen auf das *Gating* des Kanals haben. Kürzere Linker führten zu einer Zunahme, längere zu einer Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals (Niu *et al.*, 2004). Zusammen mit den Arbeiten an dem bakteriellen K<sup>+</sup>-Kanal MthK wurde ein Modell aufgestellt, dass besagt, dass die Bindung von Ca<sup>2+</sup> an flexible Spalten zwischen benachbarten RCK-Domänen zu einem Zug an den Linkern, die den *Gating-Ring* mit dem *Gate* verbindet, führt. Dieser Zug führt letztendlich zu einem Öffnen des Kanals (Niu *et al.*, 2004; Papazian, 2004). Der *Gating-Ring* ist ein Beispiel für die komplexe mechanische Kopplung von Ligandenbindung und Kanalöffnung und zeigt einen möglichen Mechanismus wie die Bindung eines Liganden, an einer anderen Stelle als dem eigentlichen *Gate*, auf das *Gate* am Kreuzungspunkt der inneren Helices übertragen werden kann.



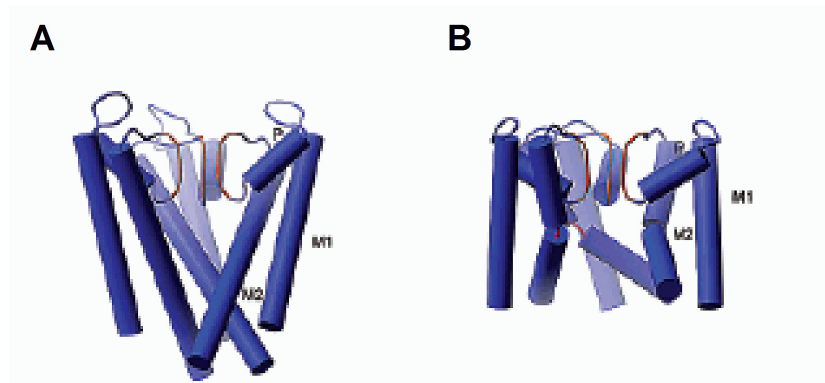
**Abb. 3: Ca<sup>2+</sup>-abhängiges Gating.** Ca<sup>2+</sup> bindet an den intrazellulären *Gating-Ring*, der aus 8 RCK-Domänen besteht (2 der 4 Untereinheiten und 4 der 8 RCK-Domänen sind gezeigt). Es kommt zu einer Erweiterung des *Gating-Rings*, dadurch zu einem Zug an den S6-RCK1-Linkern, der zu einem Öffnen des Kanals führt (nach Niu *et al.*, 2004).

Ein weiteres Modell für ligandenabhängiges-*Gating* basiert auf Arbeiten an den ATP-sensitiven Kaliumkanälen ( $K_{ATP}$ ). In  $K_{ATP}$ -Kanälen führt eine Bindung von ATP oder ADP zu einer Kanalinhibition (Tucker *et al.*, 1998).  $K_{ATP}$ -Kanäle bestehen aus porenformenden Untereinheiten der Kir6.2-Familie und den Sulfonylharnstoffrezeptoren (SURs) als zusätzlichen (alpha)-Untereinheiten. ATP interagiert sowohl mit den Kir6.2- als auch mit den SUR-Untereinheiten (Tucker *et al.*, 1998). In verschiedenen Arbeiten wurden die ATP-Bindestellen in den cytoplasmatischen N- und C-terminalen Domänen lokalisiert (Drain *et al.*, 1998; Antcliff *et al.*, 2005) und ein mögliches Model aufgestellt wie ATP-Bindung auf die Transmembranelemente des Kanals übertragen wird und somit zu einem Schließen des *Gates* führt (Antcliff *et al.*, 2005). Durch Konformationswechsel in den cytoplasmatischen Domänen bei der ATP-Bindung, kommt es möglicherweise zu einer Bewegung der N-terminalen *slide* Helix. Diese Bewegung wird auf das *Gate* übertragen und führt zum Schließen des Kanals.

In den letzten Jahren hat man erkannt, dass negative Membranphospholipide wie  $PIP_2$  in physiologischen Konzentrationen die Nukleotidempfindlichkeit der  $K_{ATP}$ -Kanäle durch Interaktion mit der Kir6.2-Untereinheit reduzieren. Eine Erhöhung der  $PIP_2$ -Konzentration führt zu einer Stabilisierung des Offenzustands des Kanals (Shyng *et al.*, 2000; Schulze *et al.*, 2003). Der antagonistische Effekt von  $PIP_2$  auf die ATP-Inhibition lässt darauf schließen, dass die zwei Liganden funktionell um die Interaktion mit dem Kanal konkurrieren. Es wurden sowohl im C-Terminus als auch im N-Terminus von Kir6.2 Regionen gefunden, die wichtig sind für die ATP-Inhibition und die Bindung von  $PIP_2$  (Shyng *et al.*, 2000; Schulze *et al.*, 2003). Jeder Ligand interagiert mit separaten, aber überlappenden Bindestellen an den gleichen Domänen. Einmal führt die Bindung zu einer Stabilisierung des geschlossenen (ATP) und im anderen Fall zur Stabilisierung des offenen ( $PIP_2$ ) Zustands. Diese Ergebnisse zeigen wie die Bindung von unterschiedlichen Liganden an die gleiche Domäne zu verschiedenen *Gating*-Prozessen, nämlich einmal zum Öffnen und einmal zum Schließen des Kanals führen kann.

Ein weiterer *Gating*-Mechanismus beruht auf einem Konformationswechsel wonach die innere Helix beim Öffnen des Kanals an einem konservierten Glycinrest abknickt und sich beim Schließen wieder gerade ausrichtet (Abb. 4) (Magidovich und Yifrach, 2004). Dies ist unabhängig davon, ob die Kanäle liganden- oder spannungsabhängig öffnen. Dieser konservierte Glycinrest findet sich sowohl in der zweiten Transmembrandomäne in den Kaliumkanälen vom 2TM-Typ KcsA und MthK (Abb. 4), als auch in der sechsten Transmembrandomäne vieler Kaliumkanäle vom 6TM-Typ. Diese konservierte Position lässt darauf schließen, dass der Konformationswechsel beim Kanalöffnen ähnlich sein muss, unabhängig davon ob der Stimulus zum Öffnen durch eine Ligandenbindung oder durch Änderungen der Membranspannung erfolgt. Untersuchungen an den spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanälen hBK und *Shaker* zeigten, dass Mutationen an diesem konservierten Glycinrest Auswirkungen auf das Öffnen des Kanals haben. In dem *Shaker*-Kanal Kv 1.1 führte ein Austausch von Glycin gegen Ala-

nin und andere Aminosäuren zu einem verhinderten Öffnen des Kanals. Ein Austausch gegen die Aminosäure Prolin, die ein Strecken der Helix unterbindet, führt zu einem offenen Kanal, der nicht mehr korrekt schließen kann. In dem ligandenabhängigen hBK-Kanal führt eine Mutation an dem konservierten Glycinrest zu einer noch stärkeren Beeinträchtigung des Öffnens des Kanals (Magidovich und Yifrach, 2004). Die Konservierung dieses Glycinrestes in der inneren Helix unterschiedlicher Kaliumkanäle reflektiert das Erfordernis für einen flexiblen Knickpunkt, der für das Öffnen des *Gates* nötig ist.



**Abb. 4:** KcsA im geschlossenen Zustand (A) und MthK im offenen Zustand (B). Dargestellt sind jeweils drei Untereinheiten (nach Magidovich und Yifrach *et al.*, 2004).

Ein weiteres konserviertes Motiv, das PXP-Motiv, im unteren Teil des S6-Segment von Kv-Kanälen trägt ebenfalls zur intrazellulären *Gating*-Struktur bei (Labro *et al.*, 2003). Mutationen an diesem Motiv führten zu einem veränderten Kanalverhalten. Diese Untersuchungen heben eine wichtige Rolle dieser Prolinreste hervor und zeigen, dass eine Destabilisierung und Biegung der S6-Helix durch das PXP-Motiv offensichtlich eine flexible Drehachse schafft, die eine Bewegung des unteren Teils der S6-Domäne während des Kanal-*Gatings* erlaubt.

Wie oben bereits beschrieben besitzen die Kaliumkanäle vom 6TM-Motiv einen Spannungssensor (S4-Domäne), der eine Rolle in der Spannungsabhängigkeit des Ionentransports spielt (Liman *et al.*, 1991). Die Änderung des Membranpotentials führt zu einer Bewegung dieses Proteinabschnitts und dadurch wahrscheinlich zum Öffnen oder Schließen des *Gates* (Abb. 2B). Die Bewegungen des Spannungssensors werden durch mechanische Kopplung auf das *Gate* übertragen und es kommt zum spannungsabhängigen *Gating*. Um den Kanal zu öffnen, muss der Spannungssensor positive Arbeit leisten. Diese bewirkt eine nach außen ziehende Kraft in der Nähe der Bündelstelle der inneren Helices und führt zum Öffnen des *Gates* (Yifrach und MacKinnon, 2002). Der intrazelluläre Linker, der die vierte mit der fünften Transmembrandomäne verbindet (S4-S5-Linker), ist ein potentieller Kandidat für die strukturelle Verbindung zwischen dem Spannungssensor und dem *Gate* in Kv- und

HCN(*hyperpolarization-activated and cyclic-nucleotide-gated*)-Kanälen und scheint wichtig für das Kanal-*Gating* zu sein (Lu *et al.*, 2002). Mutationen in dieser Region beeinflussen die Spannungsabhängigkeit und Kinetik der Aktivierung (Chen *et al.*, 2001; Sanguinetti *et al.*, 1999). Die NMR-Struktur des S4-S5-Segments vom *Shaker*-Kaliumkanal weist auf eine amphipathische  $\alpha$ -helikale Konformation hin (Ohlenschläger, 2002).

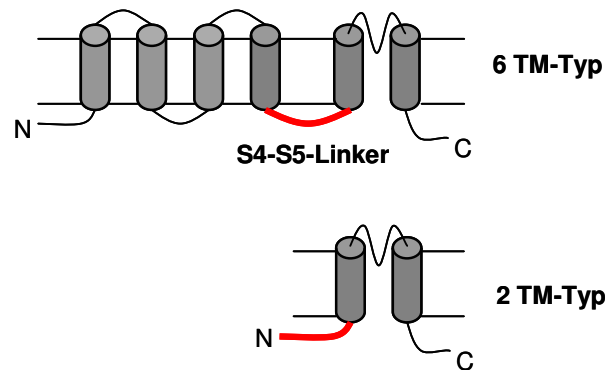
### 1.3 Struktur und Funktion N-terminaler Domänen von K<sup>+</sup>-Kanälen

Es ist bekannt, dass die im Cytoplasma liegende N-terminale Region bei Kaliumkanalproteinen wichtige Funktionen übernehmen kann.

Bei dem Kaliumkanal Kir2.1 (2TM-Typ) wurde ein Verlust der Oberflächenexpression bei Mutanten gefunden, denen die N-terminale Domäne entfernt wurde (Stockklausner und Klöcker, 2003). Auch Experimente an dem Kaliumkanal KcsA aus *Streptomyces lividans* zeigten, dass eine Deletion der ersten 20 Aminosäuren zu einer drastischen Reduktion an Expression führt (Perozo *et al.*, 1999; Cortes *et al.*, 2001). Der N-terminalen Domäne wird auch eine Beteiligung am *Gating* von einigen Kaliumkanälen zugesprochen, z.B. für KirBac1.1 (Kuo *et al.*, 2003). Die Kristallstruktur des bakteriellen Kaliumkanals KirBac1.1 hat eine  $\alpha$ -helikale Domäne aufgedeckt, die vor der ersten Transmembrandomäne liegt (Kuo *et al.*, 2003). Mit Hilfe der EPR-Spektroskopie wird eine ähnliche Domäne auch für den N-Terminus von KcsA postuliert (Cortes *et al.*, 2001). In beiden Fällen formt der N-Terminus eine amphipathische  $\alpha$ -Helix, die parallel zur Cytoplasma-Membran-Grenzschicht verläuft. Es wird vermutet, dass diese Domäne eine Rolle bei der Verankerung des Kanals in der Membran spielt (Domene *et al.*, 2004). Außerdem gibt es Spekulationen, dass diese Domäne als ein Art Linker dient, der eine mechanische Kopplung von Bewegungen in der cytoplasmatischen Domäne (*tail*) zu dem Innenteil der Kanalstruktur herstellt und somit möglicherweise am *Gating* beteiligt ist.

Wie oben bereits erwähnt, wird in den K<sub>ATP</sub>-Kanälen die ATP-Bindung auf die Transmembranelemente übertragen, was zu einem Schließen des Kanals führt (Antcliff *et al.*, 2005). Es wird postuliert, dass das *Gating* von Kir6.2 durch ATP möglicherweise zu einem Wechsel der Interaktionen zwischen den Untereinheiten führt und dass die ATP-Bindung eine Bewegung der N-terminalen *slide-helix* auslöst und dadurch zu einem Schließen des Kanals führt (Antcliff *et al.*, 2005).

Bei den Kaliumkanälen vom 6TM-Motiv entspricht der intrazelluläre S4-S5-Linker, der die vierte mit der fünften Transmembrandomäne verbindet, der N-terminalen Domäne der 2TM-Kanäle (Abb.4). Wie oben bereits erwähnt, ist dieser Linker ein potentieller Kandidat für die strukturelle Verbindung zwischen dem Spannungssensor und dem Aktivierungs-*Gate* in Kv- und HCN-Kanälen und scheint wichtig für das Kanal-*Gating* zu sein (Lu *et al.*, 2002). Auch diese Domäne zeigt eine amphipathische  $\alpha$ -helikale Konformation (Ohlenschläger, 2002).

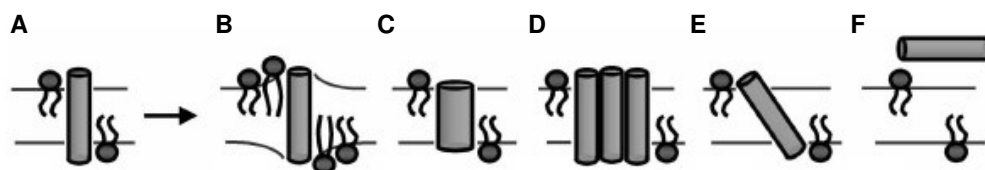


**Abb. 4:** Intrazellulärer S4-S5-Linker bei den Kaliumkanälen vom 6 TM-Motiv ist äquivalent der N-terminalen Domäne der 2 TM-Kanäle.

## 1.4 Lipid-Protein-Interaktionen

Eine Vielzahl an Untersuchungen hat gezeigt, wie wichtig die Interaktion zwischen dem Membranprotein und den Lipiden in der Membran für die Stabilisierung des Proteins in dessen Lipidumgebung ist (Yau *et al.*, 1998; Killian und von Heijne, 2000; Killian, 2003; Domene *et al.*, 2003).

Ein wichtiger Faktor hierbei ist es, ein so genanntes hydrophobes *Mismatch* zu verhindern. Solch ein hydrophobes *Mismatch* tritt zum Beispiel auf, wenn die effektive hydrophobe Länge des Proteins größer ist als die der umgebenden Lipide (Abb. 4A), was natürlich energetisch ungünstig ist. Es sind eine Reihe an Mechanismen bekannt, die ein hydrophobes *Mismatch* verhindern oder zumindest reduzieren können. Abbildung 4 zeigt mögliche Mechanismen, wie z.B. die Neigung einer zu langen Peptidgruppe in der Membran (Abb. 4E) oder die Zusammenlagerung einzelner Untereinheiten zu Oligomeren (Abb. 4D) (Killian und von Heijne, 2000).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung möglicher Mechanismen, einen hydrophoben *Mismatch* zwischen einem transmembranen Peptid und der Lipiddoppelschicht zu reduzieren (A): Anordnung der Fettsäureketten (B), Peptid-Rückgrat-Deformierung (C), Oligomerisierung des Peptids (D), Peptid-Neigung (E), kein Einbau in die Membran (F) (nach Planque und Killian, 2003).

Sehr häufig flankieren Lysinreste die Transmembransegmente. Die Seitengruppe dieser positiv geladenen Aminosäure ermöglicht das so genannte *Snorkeling*, d.h. der aliphatische Teil bleibt in der hydrophoben Umgebung der Membran, während die positiv geladene Aminogruppe sich in der polaren Oberfläche positioniert (Killian und von Heijne, 2000; Strandberg und Killian, 2003). Dieses *Snorkeling* vergrößert die effektive hydrophobe Länge des Proteinsegments. Dies ist für relativ kurze Segmente ein möglicher Mechanismus, einen hydrophoben *Mismatch* auszugleichen. Ein hydrophobes *Mismatch* beeinflusst die Aktivität und Struktur eines Membranproteins. Somit hat die Dicke der Membran, in die das Protein inseriert ist, durchaus einen Einfluss auf das Kanalverhalten. Untersuchungen an dem BK-Kanal zeigten, dass eine Änderung der Lipidkettenlänge die Leitfähigkeit des Kanals beeinflusste. Bei einer Lipidkettenlänge von C18 zeigte sich eine optimale Leitfähigkeit. Ein Verlängern oder Verkürzen führte zu einer Abnahme der Leitfähigkeit (Yuan *et al.*, 2004).

Auch die Membran-Wasser Grenzschicht spielt eine wichtige Rolle in der Struktur und Funktion von Transmembranproteinen. Diese Interaktionen sind von den spezifischen Eigenschaften der Aminosäure-Seitenketten des Proteins abhängig. So kommt es z.B. zu elektrostatischen Interaktionen zwischen positiv geladenen Aminosäuren des Proteins und den negativ geladenen Kopfgruppen der Lipide.

Für die N-terminale amphipatische *slide*-Helix von KirBac1.1 wird postuliert, dass sie mit den Lipid-Kopfgruppen interagiert (Domene *et al.*, 2004). Auch für KcsA wurde gezeigt, dass Lipid-Protein-Interaktionen wichtig sind für die Kanalfunktion. In diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass negativ geladene Lipide notwendig sind für die Aktivität von KcsA (Valiyaveetil *et al.*, 2002) und dass spezifische Lipide die Oligomerisierung, den Zusammenbau und die Stabilität von KcsA beeinflussen (Demmers *et al.*, 2003; Brink-van der Laan *et al.*, 2004). Simulationen an KcsA lieferten weitere Details über Lipid-Protein-Interaktionen (Domene *et al.*, 2003).

Auch die *Gating*-Eigenschaften können durch die Lipidumgebung eines Membranproteins, die Protein-Lipid-Interaktionen und die Dicke der Membran, in die das Protein inseriert wurde, beeinflusst werden.

Kanäle sind wie gezeigt dynamische Strukturen, die in Anwesenheit von bestimmten Effektoren einen Konformationswechsel eingehen, der zum Öffnen bzw. zum Schließen der Pore führt (*Gating*). Ein großes Ziel ist es, die Mechanik, die hinter diesen Bewegungen steckt, die Kopplung zwischen der Pore mit anderen regulatorischen Komponenten des Kanals und die Interaktion zwischen strukturellen Komponenten mit der Pore vollständig zu verstehen.

Kaliumkanäle liefern dafür ein geeignetes Testsystem, da sowohl strukturelle, als auch funktionelle Daten vorhanden sind. Zur Aufklärung von allgemeinen Struktur-Funktions-Zusammenhängen von Kaliumkanälen sind minimale Modellproteine besonders gut geeignet.

Deshalb wurde in dieser Arbeit der minimale Kaliumkanal Kcv aus dem *Paramecium bursaria* Chlorellavirus verwendet, um Beziehungen zwischen der Struktur des Membranproteins und dessen Funktion zu untersuchen.

## 1.5 Der Kaliumkanal Kcv

### 1.5.1 Kcv – ein viraler Kaliumkanal

Kcv (Kanal Chlorellavirus) ist der erste bekannte funktionelle Kaliumkanal aus einem Virus (Plugge *et al.*, 2000). Kcv wird codiert von dem *Paramecium bursaria* Chlorellavirus (PBCV-1). PBCV-1 gehört zur Familie der *Phycodnaviridae* und besitzt eine eikosaedrische Morphologie, eine interne Lipidmembran und ein großes doppelsträngiges DNA-Genom (330 kb) (Van Etten *et al.*, 2002). Mitglieder der Familie *Phycodnaviridae* sind weltweit verbreitet und ihre Wirte sind eukaryotische Algen verschiedener Ordnungen. Der Wirt von PBCV-1 ist eine im Süßwasser lebende *Chlorella*-ähnliche Grünalge (NC-64A), die in der Natur nur als Endosymbiont des Pantoffeltierchens *Paramecium bursaria* vorkommt.

Kcv hat alle Merkmale, die auch eukaryotische Kaliumkanalproteine auszeichnen (Abb. 5) (Plugge *et al.*, 2000). Das Selektivitätsfilter-Motiv GFG liegt in einer Domäne zwischen zwei Transmembransegmenten. Kcv besitzt nur einen kurzen, 12 Aminosäuren langen, cytoplasmatischen N-Terminus. Der C-Terminus des Kcv-Proteins ist Teil der zweiten Transmembrandomäne, somit fehlt Kcv ein cytoplasmatischer C-Terminus. Die heterologe Expression von Kcv in Säugerzellen (Moroni *et al.*, 2002) und in Oozyten von *Xenopus laevis* (Plugge *et al.*, 2000) erzeugt eine K<sup>+</sup>-selektive Leitfähigkeit. Diese K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit zeigt eine gewisse Spannungsabhängigkeit und ist durch Kaliumkanalhemmstoffe zu inhibieren. Mit 94 Aminosäuren bildet Kcv den kleinsten funktionellen Kaliumkanal (Plugge *et al.*, 2000) und ist deshalb als Minimalmodell für die Aufklärung von Struktur-Funktions-Zusammenhängen bei Kaliumkanalproteinen besonders geeignet (Gazzarrini *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2004).

Bisher wurden aus weiteren 40 Chlorellaviren funktionelle Kcv-Varianten isoliert, die sich in maximal 12 Aminosäuren von dem Referenzkanal Kcv aus PBCV-1 unterscheiden. Alle Kcv-Varianten produzieren einen funktionellen K<sup>+</sup>-selektiven Kanal in *Xenopus* Oozyten. Es wurden bisher sechs Varianten, die sich in ihrer Kinetik und Permeabilität von Kcv unterscheiden, beschrieben (Kang *et al.*, 2004).

Es gibt einige deutliche Hinweise darauf, dass der Kaliumkanal Kcv für die Vermehrung des Chlorellavirus essentiell ist: Kaliumkanalhemmstoffe wie Barium und Amantadin hemmten die Aktivität von Kcv (heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert) mit dem gleichen Dosis-Wirkungs-Verhältnis wie auch die Replikation des Virus in *Plaque*-Tests gehemmt wurde (Plugge *et al.*, 2000). In weiteren Untersuchungen gibt es deutliche Hinweise dafür, dass Kcv im Viruspartikel lokalisiert ist und eine essentielle Funktion während der ersten Minuten der Infektion spielt (Mehmel *et al.*, 2003).

Virus-codierte Ionentransportproteine wurden bereits in Influenzaviren (Pinto *et al.*, 1992; Sunstrom *et al.*, 1996) und dem Aidsvirus HIV-1 (Piller *et al.*, 1996; Schubert *et al.*, 1996) gefunden, doch hat keines dieser Proteine Sequenzähnlichkeiten mit zellulären Transportproteinen. Das M2-Protein aus dem humanpathogenen Influenza A Virus bildet als Tetramer einen Protonenkanal, der zwei unterschiedliche Aufgaben bei der viralen Replikation erfüllt (Pinto *et al.*, 1992; Tosteson *et al.*, 1994; Martin und Helenius, 1991; Lamb und Pinto, 1997). Das Vpu Protein aus HIV-1 bildet in heterologen Expressionssystemen (Ewart *et al.*, 2002) und rekonstituiert im Lipid-bilayer (Schubert *et al.*, 1996) einen Kationenkanal. Auch Vpu werden zwei unabhängige physiologische Funktionen zugeschrieben (Kochendoerfer *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 1993; Schubert *et al.*, 1996). Diese Proteine, die den Durchtritt von Ionen und kleineren Molekülen durch Membranen vermitteln, werden auch als Viroporine bezeichnet (Carrasco, 1995). Viroporine wurden bisher in Viren aus neun Familien beschrieben (Gonzales und Carrasco, 2003), jedoch ist die genaue physiologische Funktion im Replikationszyklus der Viren in den meisten Fällen ungeklärt.

Das Genom eines weiteren Virus der Familie *Phycodnaviridae* ist ebenfalls vollständig sequenziert: *Ectocarpus siliculosus* Virus EsV-1 (Delaroque *et al.*, 2001). EsV-1 infiziert die fädige Braunalge *Ectocarpus siliculosus*, die an allen Meeresküsten gemäßigter Breiten vorkommt. Auch EsV-1 codiert für einen funktionellen Kaliumkanal (Kesv), der große Ähnlichkeit zu dem Kaliumkanal Kcv aus PBCV-1 hat (Chen *et al.*, 2005; Delaroque *et al.*, 2001; Doktorarbeit Mario Mehmel).

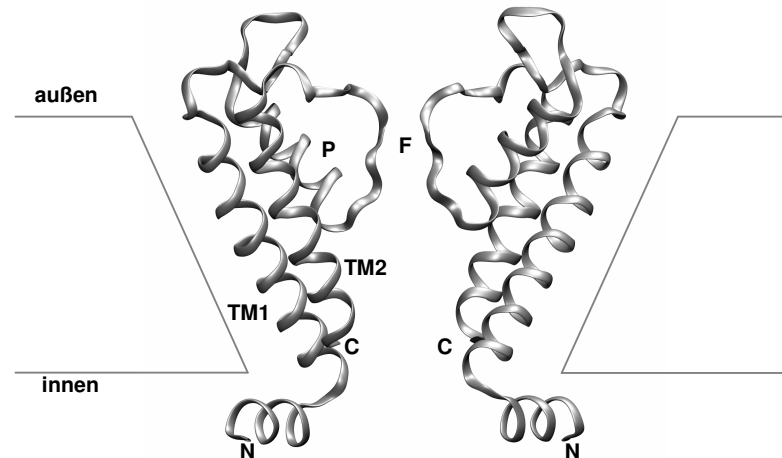
Studien an solchen minimalen viralen Kaliumkanälen, wie Kesv und Kcv, können Informationen über die grundlegende Bedeutung von Kaliumkanälen als Viroporine liefern und außerdem helfen, Struktur-Funktions-Zusammenhänge bei Kaliumkanalproteinen aufzuklären.

## 1.5.2 Kcv - Struktur-Funktionsanalysen

In dieser Arbeit benutzte ich den minimalen viralen Kaliumkanal Kcv, um die Rolle des kurzen cytoplasmatischen N-Terminus in Kombination mit der ersten Transmembrandomäne am Kanal-Gating zu untersuchen.

Dieser Ansatz wird durch verschiedene Beobachtungen gestützt. i.) Kcv hat viele funktionelle Eigenschaften, die mit anderen mehr komplexen K<sup>+</sup>-Kanälen übereinstimmen (Plugge *et al.*, 2000), ii.) im Gegensatz zu den bakteriellen Kanälen lässt sich Kcv und seine Mutanten leicht in heterologen Systemen exprimieren, so in *Xenopus* Oocyten und tierischen Zelllinien (Plugge *et al.*, 2000; Moroni *et al.*, 2002; Gazzarrini *et al.*, 2003) iii.) Homologie-Modellierung von Kcv an der KirBac1.1 Struktur offenbart für den viralen Kanal eine Struktur, die ähnlich zu dem bakteriellen K<sup>+</sup>-Kanal KirBac1.1 (und auch KcsA) ist (Gazzarrini *et al.*, 2003). Diese Ähnlichkeit beinhaltet das Vorhandensein und Positionieren von Elementen, wie Porendomäne, Selektivitätsfilter und Transmembrandomänen. Besonders bemerkenswert ist, dass das

Homologiemodell für die N-terminale Region von Kcv eine helikale Struktur voraussagt, welche ähnlich zu der in KirBac1.1 ist (Abb. 5, iv.) in früheren Untersuchungen wurde schon gezeigt, dass ein Entfernen der ersten 14 Aminosäuren vom N-Terminus im Kcv Protein den Kanal inaktiviert. Diese Ergebnisse schlagen eine Rolle dieser Domäne an der Kanalfunktion vor (Moroni *et al.*, 2002).



**Abb. 5: Strukturmodell von dem viralen Kaliumkanal Kcv.** Zwei von vier Proteinuntereinheiten sind in der Seitenansicht gezeigt. Die Transmembranhelices (TM1 und TM2) und die Porenhelix (P) sind als Band dargestellt. (F) stellt die Filterregion dar (von Sascha Tayefeh zur Verfügung gestellt).

Wie oben bereits beschrieben, können cytoplasmatische N-Termini von Kaliumkanalproteinen an einer Reihe von Regulationen und Interaktionen beteiligt sein. Auch ein funktionaler Kcv-Kanal müsste aus vier Untereinheiten aufgebaut sein. Da der N-Terminus von Kcv jedoch zu kurz ist, um Tetramerisierungsdomänen zu bilden, müssen für die Zusammensetzung des Tetramers Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Transmembranregionen angenommen werden. Solche Interaktionen sind z.B. für Kir2.1-Tetramere beschrieben worden (Minor *et al.*, 1999). Auch für Interaktionen mit zellulären Regulatoren, wie z.B. bei den komplexeren Kir-Kanälen, mit speziellen cytoplasmatischen Domänen, die mit G-Proteinen oder verschiedenen Rezeptoren interagieren (Karschin *et al.*, 1997), lässt der kurze cytoplasmatische N-Terminus von Kcv wenig Spielraum. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass membrangängige Proteinkinase-Inhibitoren (Staurosporine, H89, A3) die Kcv-Leitfähigkeit in *Xenopus* Oocyten inhibieren (Gazzarrini *et al.*, 2003). In der Kcv Sequenz wurden 2 mögliche CK2-Phosphorylierungsstellen identifiziert. Eine davon ( $^9\text{TRTE}^{12}$ ) ist im cytoplasmatischen N-Terminus lokalisiert. Jedoch hatte eine Mutation in dieser Region (T9A) keinen Effekt auf die Kanaleigenschaften und auf die Sensitivität von Kcv zu Proteinkinase-Inhibitoren (Gazzarrini *et al.*, 2003).

Kcv zeigt in den unterschiedlichen Expressionssystemen bei extrem negativen und positiven Spannungen eine Spannungsabhängigkeit. Da Kcv einen relativ hydrophoben N-Terminus besitzt, der positiv geladene Aminosäuren enthält und somit möglicherweise membranständig ist und als Spannungssensor fungieren kann, wurden schon in früheren Experimenten die beiden positiv geladenen Aminosäuren im N-Terminus von Kcv gegen Alanin ausgetauscht (Kcv-K6A-R10A). Diese Doppelmutation hatte jedoch keinen Effekt auf die Spannungsabhängigkeit des Kcv-Kanals (Gazzarrini *et al.*, 2003).

Trotzdem führt ein Entfernen der ersten 14 Aminosäuren von der N-terminalen Domäne von Kcv zu einem nicht funktionellen Kanal (Moroni *et al.*, 2002). Der N-Terminus könnte somit eine mögliche Rolle im Kanal-Gating spielen. Dafür spricht auch die Homologie der N-terminalen Region von Kcv zu dem bakteriellen Kaliumkanal KirBac1.1. Möglicherweise verläuft der N-Terminus von Kcv parallel zur Cytoplasma-Membran-Grenzschicht und verankert das Protein in der Membran.

Für eine solche Positionierung der N-terminalen Region parallel zur Membran-Cytoplasma-Grenzschicht muss das Protein zwischen der N-terminalen Helix und der ersten Transmembrandomäne abknicken. Die ideale Aminosäure um solch einen Winkel zu formen, ist die Aminosäure Prolin. Prolinreste zerstören die reguläre Struktur von Helices durch Bildung eines Knicks zwischen den anliegenden Segmenten (Cordes *et al.*, 2002). Prolinreste sind weit verbreitet in Transmembranhelices von Transportproteinen und scheinen im Besonderen Fall von Ionenkanälen eine funktionelle Rolle im Gating-Mechanismus zu spielen (Tieleman *et al.*, 2001; Labro *et al.*, 2003). Bei der Untersuchung der Verteilung von Prolinresten in Transmembranhelices wurde eine Bevorzugung der terminalen und zentralen Region gefunden (Ulmschneider und Sansom, 2001; Cordes *et al.*, 2002). Die Strukturvorhersage von Kcv zeigt, dass sich Prolin an Position 13 an der richtigen Stelle, nämlich vor dem prognostizierten Beginn der Transmembranhelix, befindet, um solch einen Winkel zu bilden.

Auch die Membrandicke scheint einen Einfluss auf das Kanalverhalten von Kcv zu haben. In früheren Arbeiten wurden bereits die Stromantworten von Kcv exprimiert in menschlichen Zellen mit denen in *Xenopus* Oocyten verglichen und bestimmte Unterschiede festgestellt (Gazzarrini *et al.*, 2003): Im Vergleich zu Kcv in HEK293-Zellen zeigt Kcv in *Xenopus* Oocyten bei negativen Spannungen eine zeitabhängige Aktivierung, bei positiven Spannungen werden die Kanäle träge inaktiviert (Plugge *et al.*, 2000; Gazzarrini *et al.*, 2003). Der zeitabhängige Strom, welcher eine typische Komponente der Leitfähigkeit in Oocyten ist fehlt bei Kcv exprimiert in HEK293-Zellen. Es ist bekannt, dass Expressionssysteme die Eigenschaften von Kanälen beeinflussen können (z.B. Petersen *et al.*, 1999). Dieser Unterschied kann durch Unterschiede in der Lipidzusammensetzung oder Membrandicke in den unterschiedlichen Expressionssystemen zustande kommen.

Ferner wurde eine Rolle der ersten Transmembrandomäne an der Kanalfunktion postuliert (Gazzarrini *et al.*, 2004). Wie oben bereits erwähnt, wurden bisher sechs unterschiedliche Kcv-Varianten beschrieben (Kang *et al.*, 2004). Einige davon zeigen Aminosäureunterschiede in der ersten Transmembrandomäne im Vergleich zu Kcv aus PBCV-1. Es wurde ein Einfluss dieser Aminosäuren in der TM1 der unterschiedlichen Varianten an den Kanaleigenschaften festgestellt. Weitere Untersuchungen lassen darauf schließen, dass es eine Interaktion zwischen der TM1 und dem Selektivitätsfilter geben muss (Gazzarrini *et al.*, 2004) und somit die TM1 eine Funktion beim Kanal-*Gating* spielt.

## 1.6 Zielsetzung

Die Untersuchungen in dieser Arbeit sind ein Beitrag zur Aufklärung von allgemeinen Struktur-Funktions-Zusammenhängen von Kaliumkanälen mit Hilfe des minimalen Modellproteins Kcv.

Es war bekannt, dass der N-Terminus von Kcv essentiell für die Kanalfunktion ist (Moroni *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde deshalb besonders die Rolle des kurzen cytoplasmatischen N-Terminus von Kcv in Kombination mit seinem Interaktionspartner, der ersten Transmembrandomäne (TM1), untersucht: Durch Punktmutationen und Deletionen im N-Terminus sollten die Aminosäurereste identifiziert werden, die für die Kcv-typische Leitfähigkeit verantwortlich sind. Außerdem wurde der Einfluss der Länge des N-Terminus in einem weiteren Versuchsteil untersucht.

Mit Standardmethoden der Elektrophysiologie wurde getestet ob verschiedene Kcv-Mutanten in den Zellen des Expressionssystems (HEK293-Zellen) Leitfähigkeitsänderungen mit Kcv-Eigenschaften induzieren können.

Der Prolinreste 13 im Kcv Protein bedingt vermutlich die Lage des N-Terminus parallel zur Cytoplasma-Membran-Grenzschicht. Durch Mutationen an dieser Position sollte deshalb gezeigt werden, ob diese Aminosäure wichtig ist für die Positionierung der N-terminalen Domäne und möglicherweise das Kanal-*Gating* beeinflusst.

Daraus ergaben sich weitere Untersuchungen, die sich mit der Auswirkung der Länge der TM1 an der Kanalfunktion beschäftigten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, über die Firmen AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad (München), GibcoBRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Fluka (Buchs, Schweiz) und Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen) bezogen.

### 2.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen waren von New England Biolabs (NEB, Frankfurt a.M.) oder MBI Fermentas (St. Leon-Rot).

Für die PCR wurden *Taq* oder *Pfu* DNA-Polymerase, die entsprechenden 10 x Polymerase-Puffer und dNTPs von Promega (Mannheim) verwendet.

### 2.3 Größenstandards

1 kb oder 100 kb DNA Ladder (NEB, Frankfurt a.M.)

Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards All Blue und Kaleidoscope Prestained Standards (beide Bio-Rad, München)

### 2.4 Reaktionssysteme (Kits)

*GenElute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

*HiSpeed<sup>TM</sup> Plasmid Midi Kit* (Qiagen, Hilden)

*GenElute<sup>TM</sup> High Performance Plasmid Midiprep Kit* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

*MinElute<sup>TM</sup> Reaction Cleanup Kit* (Qiagen, Hilden)

Wenn nicht anders angegeben, wurden bei der Verwendung von Reaktionssystemen stets die Angaben des Herstellers befolgt.

### 2.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide (Primer) wurden von Sigma Genosys (Steinheim) und Biomers (Ulm) synthetisiert.

Die Sequenzen der einzelnen Primer sind im Anhang aufgelistet.

### 2.6 Antikörper

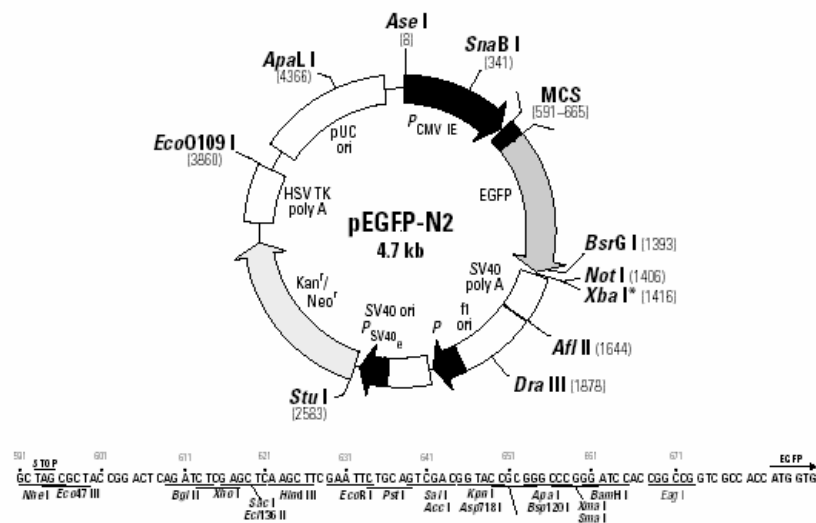
**Anti-GFP (JL-8)**, mouse monoclonal antibody (BD Biosciences Clontech, Heidelberg)

**Alkaline Phosphatase-Konjugat**, goat anti-mouse (Sigma, Deisenhofen)

## 2.7 Plasmide

### pEGFP-N2 (BD Biosciences Clontech, Heidelberg)

pEGFP-N2 codiert für eine „red-shift“-Variante des Wildtyps des Green Fluorescent Protein (GFP). GFP ist ein Protein der Qualle *Aequorea victoria*, das bei entsprechender Anregung fluoresziert. Es dient in dieser Arbeit als Marker für die Genexpression und für Lokalisationsstudien (Prasher *et al.*, 1992; Chalfie *et al.*, 1994). Die Kcv-Mutanten wurden zwischen die Schnittstellen Bgl II und EcoRI in die *multiple cloning site* (MCS) kloniert. Alle in dieser Arbeit in HEK293-Zellen untersuchten Kcv-Mutanten wurden als Fusionsproteinen mit EGFP hergestellt.



**Abb. 6:** Plasmid pEGFP-N2 (4700 bp) mit multipler Klonierungsstelle (MCS) und deren Restriktionschnittstellen (Clontech).

### pSGEM

pSGEM ist ein modifizierter pGEMHE Expressionsvektor für *Xenopus* Oozyten, der freundlicherweise von M. Hollmann, Max Planck Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen zur Verfügung gestellt wurde.

Für das Konstrukt wurde der Vektor pGEMHE (Liman *et al.*, 1992) um die multiple Klonierungsstelle von pBluescript erweitert. Grundlage des Konstruktes pGEMHE ist der Vektor pGEM-3Z (Promega, Mannheim), in den die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des  $\beta$ -Globingens aus *Xenopus laevis* eingefügt wurden.

#### pGEM-3Z:

- $\beta$ -Lactamase-Gen (Ampicillin-Resistenz)
- lacZ-Gen ( $\alpha$ -Komplementation für Blau-Weiß-Selektion)

- T7 RNA-Polymerase-Promotor
- Zugangsnummer: Genbank X65304

## 2.8 Heterologe Expressionssysteme

Die heterologe Expression von Proteinen, das heißt die Expression in einer fremden Zelle, die normalerweise nicht über das untersuchte Protein verfügt, hat neue Möglichkeiten der Erforschung von Ionenkanälen eröffnet. So z.B. die Untersuchung mutierter Kanäle.

Als Expressionssysteme wurden in dieser Arbeit humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) und *Xenopus laevis* Oocyten verwendet.

### Eukaryotische Zelllinie HEK293

Diese Zelllinie wurde durch Einbringen von gescherter Adenovirus-DNA in embryonale Zellen hergestellt (Graham *et al.*, 1977). Sie wurden zur transienten Expression der Kanalproteine verwendet und in DMEM/F12 mit 10% (v/v) FCS, 2,5 mM Glutamin und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-begasteten Brutschrank (Heraeus) unter standardisierten Bedingungen von 37 °C und 4-5 % CO<sub>2</sub>.

### *Xenopus laevis* Oocyten

Die Eizellen aus dem südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* werden schon seit langem vermehrt in der Molekular- und Zellbiologie sowie in den Disziplinen Entwicklungs- und Elektrophysiologie, Genetik, Pharmakologie, Biophysik und Biochemie als Studienobjekte herangezogen (Hilken, Iglauer und Richter, 1997). Die Oocyten haben den Vorteil als Einzelzellen sehr groß zu sein (Durchmesser ca. 1 mm), so dass man sehr leicht mittels eines Injektors cRNA in die Oocyten injizieren kann.

## 2.9 Sterilisation von Lösungen und Arbeitsgeräten

Lösungen, Nährmedien, Puffer, Einmalplastikmaterialien und Glasmaterial wurden 20 min in feuchter Hitze bei 1,5 bar/121 °C autoklaviert. Die Sterilisation von Glaspipetten erfolgte über 4-5 h bei 180 °C im Trockenschrank. Thermolabile Lösungen und Puffer wurden durch Sterilfiltration (0,2 µm Filter / Schleicher & Schuell) entkeimt.

## 2.10 Molekularbiologische Methoden

### 2.10.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Amplifikation von Fragmenten aus Kcv-wt und für die *site directed* Mutagenese eingesetzt. Die Reaktionen wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäßen mit dem Multi Cycler PTC (MJ Research, Watertown, MA, USA) durchgeführt.

### Amplifikation von Fragmenten aus Kcv-wt

Die Standardform der *polymerase chain reaction* (PCR) war ein 50 µl-Ansatz mit 30-50 ng *template*-DNA, 40 pmol dNTP-Mix (10 pmol je dNTP), je 100 pmol eines Vorwärts- und eines Rückwärtsprimers, 5 µl 10 x Polymerase-Puffer, 75 pmol MgCl<sub>2</sub> und 2,5 U *Taq*-DNA Polymerase.

#### Standard-PCR-Programm:

3 min bei 95 °C (Denaturierung der DNA)  
 30 Zyklen mit            30 s bei 95 °C (Denaturierung der DNA)  
                               30 s bei 55-65 °C (Hybridisierung der Primer)  
                               45 s bei 72 °C (Elongation durch die *Taq*-Polymerase)  
 5 min bei 72 °C (Auffüllen unvollständiger Amplifikate)

Mit der Standard-PCR wurden die ΔN-Kcv-Mutanten aus Kcv-pEGFP mit den im Anhang angegebenen Primern amplifiziert. Die Primer fügten (5') *Bgl*III und (3') *Eco*RI Restriktionsschnittstellen ein. Das PCR-Produkt wurde mit den beiden entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und nach Reinigung über ein *MinElute*<sup>TM</sup> *Reaction Cleanup Kit* in den, mit entsprechenden Restriktionsenzymen, ebenfalls vorher linearisierten Säugerzell-Expressionsvektor pEGFP-N2 in das Leseraster, stromaufwärts des EGFP-Gens, ligiert.

### Site directed Mutagenese

Für die Konstruktion der Kcv-Mutanten wurde das Protokoll des *QuickChange*<sup>TM</sup> *Site Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) verwendet. In dieser PCR-basierten Methode wurde das Konstrukt Kcv-pEGFP bzw. Kcv-pSGEM als Templat zusammen mit den im Anhang aufgelisteten Mutagenese-Primern eingesetzt.

Es wurde ein 50 µl-Ansatz mit 30-50 ng *template*-DNA, 40 pmol dNTP-Mix (10 pmol je dNTP), je 125 ng eines Vorwärts- und eines Rückwärtsprimers, 5 µl 10 x Reaktions-Puffer und 3 U *Pfu*-DNA Polymerase eingesetzt.

#### PCR-Programm:

5 min 95 °C (Denaturierung der DNA)  
 16 Zyklen mit            30 s bei 95 °C (Denaturierung der DNA)  
                               60 s bei 55 °C (Hybridisierung der Primer)  
                               11 min bei 68 °C (Elongation durch die *Pfu*-Polymerase)  
 10 min 68 °C (Auffüllen unvollständiger Amplifikate)  
 ∞ 4 °C Stopp der Reaktion

Zum Verdau der methylierten, nicht mutierten *template*-DNA, wurden die PCR Produkte mit 10 U *DpnI* für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Hitze-Schock Transformation von *E.coli*.

### 2.10.2 Ligation von DNA-Fragmenten

In der Ligation wird ein DNA-Fragment mit dem gewünschten linearisierten Vektor mit Hilfe einer DNA-Ligase verknüpft. Für die Ligation wurden die PCR-Produkte und der Expressionsvektor pEGFP-N2 mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *EcoRI* verdaut.

Ligationsansatz:

- 1 µl pEGFP-N2 (ca. 500 µg/µl)
- 5-10 µl gereinigtes PCR-Produkt
- 2 µl 10 x T4 DNA-Ligase-Puffer (NEB, Frankfurt a.M.)
- 1 µl T4 DNA-Ligase (400 U/µl) (NEB, Frankfurt a.M.)
- ad 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Transformation von *E.coli* durch Elektroporation.

### 2.10.3 Kultivierung von *E.coli*

Die *E. coli*-Stämme *DH5-α* und *XLBlue1* wurden zur Klonierung von Plasmiden verwendet. Die Kultivierung erfolgte im Medium nach Luria und Bertani (Bertani 1952).

LB-Medium:

- 5 g/l NaCl
- 10 g/l Bacto-Trypton
- 5 g/l Hefeextrakt
- mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt

Für das Wachstum auf Agarplatten wurde das Flüssigmedium mit 15 g/l Agar versetzt.

Die Bakterien-Stammkulturen, die als Glycerinsuspension (58 %) bei -70 °C oder als Agarstabs (LB-Medium mit 0,6 % (w/v) Agar) bei Raumtemperatur lagerten, wurden bei Bedarf auf LB-Agarplatten mit einer Impföse ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelkolonien dieser Übernachtskultur wurden für die Isolierung von Plasmid-DNA verwendet.

Zur Selektion von Transformanten diente LB-Medium oder LB-Agar mit einem Zusatz von 100 mg/l Ampicillin (pSGEM) bzw. 50 mg/l Kanamycin (pEGFP-N2). Die Zugabe der Antibiotika erfolgte nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C.

## 2.10.4 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

### Hitze-Schock Transformation chemisch kompetenter Zellen

Hitzekompetente *E. coli*-Zellen (*XLBlue1*) wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode (Hannah, 1985) hergestellt. Zur Transformation wurden 50  $\mu$ l Zellsuspension mit 1-2  $\mu$ l (50-500 ng) Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert, danach für 1 min bei 42 °C erwärmt und wieder für 2 min auf Eis gehalten. Die Antibiotikaresistenz wurde für 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln in 250  $\mu$ l SOC-Medium (20 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Glucose) in Abwesenheit von Antibiotika exprimiert. Der Transformationsansatz wurde auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### Transformation durch Elektroporation

Elektrokompetente *E. coli*-Zellen (DH5- $\alpha$ ) wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Zur Transformation wurden 40  $\mu$ l Zellsuspension mit 1  $\mu$ l (50-500 ng) Plasmid-DNA in einer Elektroporationsküvette gemischt und 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurde im *Gene Pulser II* (Bio-Rad) mit folgenden Parametern elektroporiert: 2,5 kV Vorspannung, 200  $\Omega$  Widerstand und 25  $\mu$ F Kapazität. Pulszeiten von 3-5 ms zeigten erfolgreiche Elektroporationen an. Nach der Transformation wurde 1 ml eiskaltes SOC-Medium zur Zellsuspension gegeben und dann für 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 50-150  $\mu$ l der Bakteriensuspension wurden auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

## 2.10.5 Plasmidpräparationen

Die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde mit der alkalischen Lyse nach Sambrook *et al.* (1989) oder mit dem GenElute™ Plasmid Miniprep Kit von Sigma nach Vorschrift durchgeführt. Zur Elution der DNA wurden jedoch 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (pH ca. 7) anstatt des mitgelieferten Puffers verwendet. Größere Mengen Plasmid-DNA mit hoher Reinheit wurden mit dem HiSpeed™ Plasmid Midi Kit von Qiagen oder dem GenElute™ High Performance Plasmid Midiprep Kit von Sigma nach den Angaben des Herstellers gewonnen. Jedoch wurde die Plasmid-DNA mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (pH ca. 7) anstatt des mitgelieferten Puffers eluiert. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

## 2.10.6 Quantifizierung der Plasmid-DNA und der cRNA

Die Konzentrationen wässriger DNA- oder cRNA-Lösungen wurden spektralphotometrisch anhand der Absorption von Licht bei 260 nm bestimmt (Photometer Gensys™ 5 / Spectronic, Leeds, UK). Dabei wurde eine optische Dichte (OD<sub>260 nm</sub>) von 1 einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40  $\mu$ g/ml RNA gleichgesetzt. Um Proteinverunreinigungen

gen zu registrieren, wurde zusätzlich die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Die Reinheit der Lösung wurde durch das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm abgeschätzt. Ein Verhältnis von über 1,8 gilt als Maß für geringe Verunreinigung durch Proteine (Sambrook *et al.*, 1989)

### **2.10.7 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen**

Zur Charakterisierung von DNA bzw. zu ihrem gezielten Abbau dienten spezifisch spaltende Restriktionsenzyme. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den diesbezüglichen Vorschriften der Herstellerfirmen.

### **2.10.8 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese diente in dieser Arbeit der qualitativen und quantitativen Analyse von DNA. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Um die DNA sichtbar zu machen, wurden die Gele mit 0,8-1,2 µl Ethidiumbromid 1:10000 (w/v) versetzt. Als Trägermaterial wurde Agarose verwendet; in den meisten Fällen wurden 1 %ige Agarose-Gele in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA pH 8,0) verwendet. Die jeweiligen Proben wurden mit 5 x TAE-Probenpuffer (50 % Glycerin, 1 % Bromphenolblau) versetzt und in eine Geltasche gefüllt. Gelläufe erfolgten bei 100 V für ca. 60 min. Als Längenstandard wurde die 100 bp DNA-Leiter oder die 1 kbp DNA-Leiter (NEB, Frankfurt a.M.) verwendet.

### **2.10.9 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzen aller Konstrukte wurden kontrolliert. Die Sequenzierungen wurden von Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Die Startpunkte der Sequenzierung wurden durch entsprechende Sequenzierungs-Primer gewählt (siehe Anhang).

### **2.10.10 Zellkulturführung**

Das Arbeiten mit HEK293-Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Arbeitsbank (Flow Laboratories), welche vor und nach Benutzung mit 70 %igem Ethanol gereinigt wurde. Medien und Lösungen wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

HEK293-Zellen wachsen als adhärenente Zellen. Nach Erreichen der Konfluenz und Ausbildung eines dichten Zellrasens mussten die HEK293-Zellen verdünnt und umgesetzt, d.h. passagiert werden. Die Kultivierung erfolgte in Zellkultur-Flaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> und Filterschraubkappen für den CO<sub>2</sub>-Austausch (Renner GmbH, Dannstadt). Wenn eine Konzentration von ungefähr 10<sup>6</sup> Zellen/ml erreicht war, erfolgte eine Passage.

Hierfür wurden die zu passagierenden Zellen vom Nährmedium befreit, mit 2 ml PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, mit NaOH auf pH 7,4, autoklaviert) gewaschen und nach Absaugen des PBS die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA beschichtet, um die Zellen abzulösen. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden zur Zellsuspension 5 ml Nährmedium gegeben und gemischt. Je ein Aliquot von 0,7-1,2 ml wurde in zwei neue Zellkultur-Flaschen, in die bereits 5 ml Nährmedium vorgelegt waren, überführt und wie unter 2.8. kultiviert.

Zur Kontrolle der Zellkonzentration wurden 0,5 ml der Zellsuspension mit der gleichen Menge Medium verdünnt und mit Hilfe der Bürker-Kammer mikroskopisch gezählt. Die Kammer enthält 144 größere Quadrate von je 0,04 mm<sup>2</sup> und hatte eine Tiefe von 0,1 mm. Die 144 Quadrate wurden ausgezählt und das Ergebnis anschließend mit 3480 multipliziert. Auf diese Weise konnte die Anzahl der Zellen pro ml berechnet werden.

### **2.10.11 Expression von Kcv und Kcv-Mutanten in HEK293-Zellen**

Zur Expression von Kcv und Kcv-Mutanten wurden HEK293-Zellen in 35 mm Kulturschälchen (Renner GmbH, Dannstadt) ausgesät, zu 40-60 % konfluent wachsen lassen und nach den Angaben der Gebrauchsanleitung mit *Metafectene*<sup>TM</sup> Transfektionsreagenz (Biontex, München) und 1,5 µg Plasmid-DNA transfiziert.

Kontrollzellen wurden mit Plasmid transfiziert, das nur das EGFP-Gen enthielt. Die Zellen wurden dann für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit frischem Medium versorgt.

### **2.10.12 Expression von Kcv und Kcv-Mutanten in *Xenopus* Oocyten**

Die Plasmide wurden mit dem Enzym NheI linearisiert und mit T7 RNA Polymerase (Promega Riboprobe II Core System) *in vitro* transkribiert.

30-50 ng der so gewonnenen cRNA wurde in *Xenopus laevis* Oocyten injiziert. Die Oocyten waren zuvor nach einer Standardmethode präpariert worden (Plugge *et al.* 2000). Messungen wurden 1-3 Tage nach der Injektion durchgeführt. Als Kontrolle dienten Oocyten, denen 50 nl RNA freies Wasser injiziert wurden.

## **2.11 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.11.1 Homogenisierung der HEK293-Zellen**

Die Homogenisierung der HEK293-Zellen erfolgte 2 Tage nach der Transfektion. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA von den Kulturschälchen abgelöst. Nach Zugabe von 2 ml Medium wurde die Zellsuspension in ein Falconröhrchen überführt und 8 min bei 1000 U/min zentrifugiert (Minifuge RF, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen

und zum Reinigen der Pellets 2 Waschschrirte mit je 1 ml PBS und nachfolgender Zentrifugation durchgeföhrt.

Die erhaltenen Pellets wurden auf Eis gestellt. Die eigentliche Homogenisierung erfolgte bei 4 °C durch Zugabe des Homogenisierungspuffers (200 mM Tris-HCl, 2 % SDS, pH 7.2). Nach Vortexen erfolgte eine Ultraschallbehandlung für 1 min bei 4 °C. Nach einer letzten Zentrifugation bei 13000 U/min für 5 min bei 4 °C (Biofuge primoR, Heraeus) wurde der Überstand abgenommen und bis zum Gebrauch bei -75 °C gelagert.

### **2.11.2 Proteinbestimmung**

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen geschah nach der Methode von Popov *et al.* (1975).

### **2.11.3 TCA-Fällung**

Um die Proteine aus dem Überstand der Homogenisierung zu konzentrieren, wurde eine TCA-Fällung durchgeföhrt. Zu 100 µg Gesamtprotein wurde 1 ml einer 10 %igen TCA-Lösung gegeben, gevortext und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Proteine 10 min bei 13000 U/min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (Biofuge 13, Heraeus) pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (pH ca. 7) gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand komplett entfernt.

### **2.11.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Gelelektrophorese wurde nach Laemmli (1970) durchgeföhrt. Zur Denaturierung wurden die Proteinproben aus der TCA-Fällung in Probenpuffer aufgenommen und für 15 min bei RT inkubiert. Der Probenpuffer enthielt 62,5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 8,7 % Glycerin, 3 % β-Mercaptoethanol, 2 % SDS und 0,01 % Bromphenolblau. Als Standard-Trenngel wurden 12,5 %ige Polyacrylamidgele verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in einer Mini-Protean II-Kammer (BioRad, München) durchgeföhrt. Dabei wurde ein konstanter Strom von 40 mA für 90 min angelegt.

### **2.11.5 Western-Blot-Analyse und Immunofärbung**

Die Proteine aus SDS-Gelen wurden im so genannten *Semi-Dry*-Verfahren (Bjerrum und Schafer-Nielsen 1986) auf PVDF-Membranen übertragen. Dazu wurde das SDS-Gel, drei Blotpapiere (GB005 Gel-Blotting-Papier, Schleicher & Schuell, Dassel) und eine auf Gelgröße zugeschnittene Teflonmembran (PVDF, Immobilon P, Millipore), die zuvor mit Methanol p.a. benetzt wurde, für 5 min in Blotpuffer inkubiert. Der Transfer der Proteine erfolgte in einer *Semi-Dry*-Blotapparatur (Trans-Blot® SD, Bio-Rad, München). Auf die Anode der Blotkammer wurden eine Lage Blotpapier, die Teflonmembran, das SDS-Gel und weitere

zwei Lagen Blotpapier luftblasenfrei geschichtet und danach die Blotapparatur verschlossen. Der Elektrotransfer erfolgte unter sequentieller Spannungssteigerung (15 min bei 10 V, 12,5 V und 15 V).

Die Teflonmembran wurde nach dem Blotten für 5 min mit der proteinbeladenen Seite nach unten in TBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation in TBS-Milch für 1 h, an die sich 4 Waschschrte mit TBS für je 5 min anschlossen. Danach erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers (Anti-GFP (JL-8) / Verdünnung 1:1000 in TBS) für 1 h. Nach weiteren 4 Waschschrten à 5 min mit TBS, folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Phosphatase-Konjugat, *goat anti-mouse* / Verdünnung 1:15000 in TBS) für 1 h. Nach der Inkubation wurde die Membran zweimal für je 5 min mit TBS und viermal mit AP-Puffer gewaschen und danach in Färbelösung inkubiert. Nach ausreichender Farbreaktion auf der Membran wurde diese durch mehrfaches Waschen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gestoppt und die Membran getrocknet.

#### Lösungen:

Blotpuffer:	48 mM	Tris
	39 mM	Glycin
TBS:	10 mM	Tris, mit Hcl auf pH 7,5 eingestellt
	0,9 % (w/v)	NaCl
TBS-Milch:	2 % Milchpulver in TBS	
AP-Puffer:	100 mM	Tris, mit Hcl auf pH 9,5 eingestellt
	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
NBT:	50 mg/ml 70 % (v/v) DMFA	
BCIP:	50 mg/ml 100 % (v/v) DMFA	
Färbelösung:	100 µl NTB	
	50 µl BCIP, ad 15 ml AP-Puffer	

## 2.12 Confokalmikroskopie

Die GFP-Fluoreszenz von transfizierten HEK293-Zellen wurde 2 Tage nach der Transfektion mit einem Leica TCS Spektral Confokalmikroskop detektiert, ausgerüstet mit einem Argon-Krypton-Laser (Leica Microsystems Heidelberg GmbH). Bilder wurden mit einem HCX PL APO 63x/1,2 NA Objektiv aufgenommen. EGFP wurde mit der Argon-Laserlinie (488 nm) angeregt und die Emission confokaler Schnitte bei 505-555 nm gesammelt.

Für die Darstellung und Auswertung der Bilder wurde die Leica Confocal Software 2.00 (Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Germany) verwendet.

## 2.13 Elektrophysiologie

### 2.13.1 Elektrophysiologie an HEK293-Zellen

Experimente an HEK293-Zellen wurden an Zellen durchgeführt, die 2-3 Tage nach der Transfektion bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurden. Einen Tag vor dem Experiment wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA von den Kulturschälchen abgelöst, zu einer geringen Zelldichte auf Kulturschälchen ausplattiert und über Nacht inkubiert. Messungen wurden an diesen vereinzelt Zellen im Ganzzell-Modus einer Standard *patch-clamp*-Technik (Hamill *et al.* 1981) mit einem EPC-9 Verstärker (HEKA, Lambrecht) durchgeführt. Die Aufnahme der *patch-clamp*-Daten erfolgte mit Puls Software (HEKA). Ganzzellströme wurden angeregt durch 800 ms-Spannungspulse zwischen +80 mV und -160 mV, die von einer Haltespannung von 0 mV ausgingen. Die Ströme wurden mit einer Rate von 4 kHz aufgezeichnet und ohne die Subtraktion von Leckströmen analysiert. Die Zellen wurden bei RT mit einer Badlösung umspült (2 ml/min), die 100 mM KCl, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES und 60 mM Cholin-Cl enthielt. Die Lösung wurde mit Tris auf pH 7,4 eingestellt. Die Osmolarität der Badlösungen mit abweichenden Konzentrationen wurde mit Cholin-Cl auf ca. 300 mOsmol/kg eingestellt. Die Messelektroden waren befüllt mit 10 mM NaCl, 130 mM D-Gluconsäure-Kaliumsalz, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 μM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP, 0,1 mM GTP, 5 mM Phosphocreatin-Dinatriumsalz und 5 mM HEPES. Die Lösung wurde mit KOH auf pH 7,4 eingestellt und hatte eine Osmolarität von ca. 330 mOsmol/kg.

Die gewonnenen Daten wurden mit den Programmen PulseFit (HEKA), Igor Pro Version 5.01 (WaveMetrics) und OriginPro 7.0 (OriginLab Corporation) analysiert.

### 2.13.2 Elektrophysiologie an *Xenopus* Oocyten

Für Ganzzelleableitungen wurde das herkömmliche *voltage clamp*-Verfahren mit zwei intrazellulären Elektroden angewendet (Gene Clamp 500 Verstärker und pCLAMP5.5 Software, beides Axon Instruments, USA). Beide Elektroden waren mit 3 M KCl gefüllt und hatten in 50 mM KCl Widerstände von 0,4-1,2 MΩ. Die Oocyten wurden kontinuierlich mit einer Standard-Badlösung umspült (50 mM KCl, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Hepes, pH 7,4, die Osmolarität der Lösung wurde mit Mannitol auf 215 mM eingestellt). Das Standard-Spannungsprotokoll bestand aus Schritten von der Haltespannung -20 mV zu Testspannungen zwischen +80 mV bis -180 mV, gefolgt von einem Spannungsschritt auf -80 mV.

Die gewonnenen Daten wurden mit den Programmen Clampfit (Axon Instruments), Igor Pro Version 5.01 (WaveMetrics) und OriginPro 7.0 (OriginLab Corporation) analysiert.

## 2.14 Software, Internetadressen und GenBank Nummern

Zur Auswertung und Analyse von Daten wurden Excel (Microsoft), Igor Pro Version 5.01 (WaveMetrics), Clampfit (Axon Instruments), OriginPro 7.0 (OriginLab Corporation) und PulseFit (HEKA Electronic), Leica Confocal Software 2.00 (Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Germany) benutzt.

Folgende Programme sind über das Internet frei verfügbar:

TMHMM2.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>

TMpred [http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)

SOPMA [http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)

NNPREDICT <http://www.cmpharm.ucsf.edu/%7Enomi/nnpredict.html>

PSIPRED <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>

PROF <http://www.aber.ac.uk/~phiwww/prof/>

PREDATOR <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/predator-simple.html>

PHD [http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/submit\\_def.html](http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/submit_def.html)

Sequenz-Datenbanken:

NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Das *Paramecium bursaria* Chlorellavirus (PBCV-1)-Genom ist unter NC\_000582 eingetragen. Die Sequenz von ORF a250r (*kcv*) hat die Zugangsnummer AY3382212.

### 3. Ergebnisse

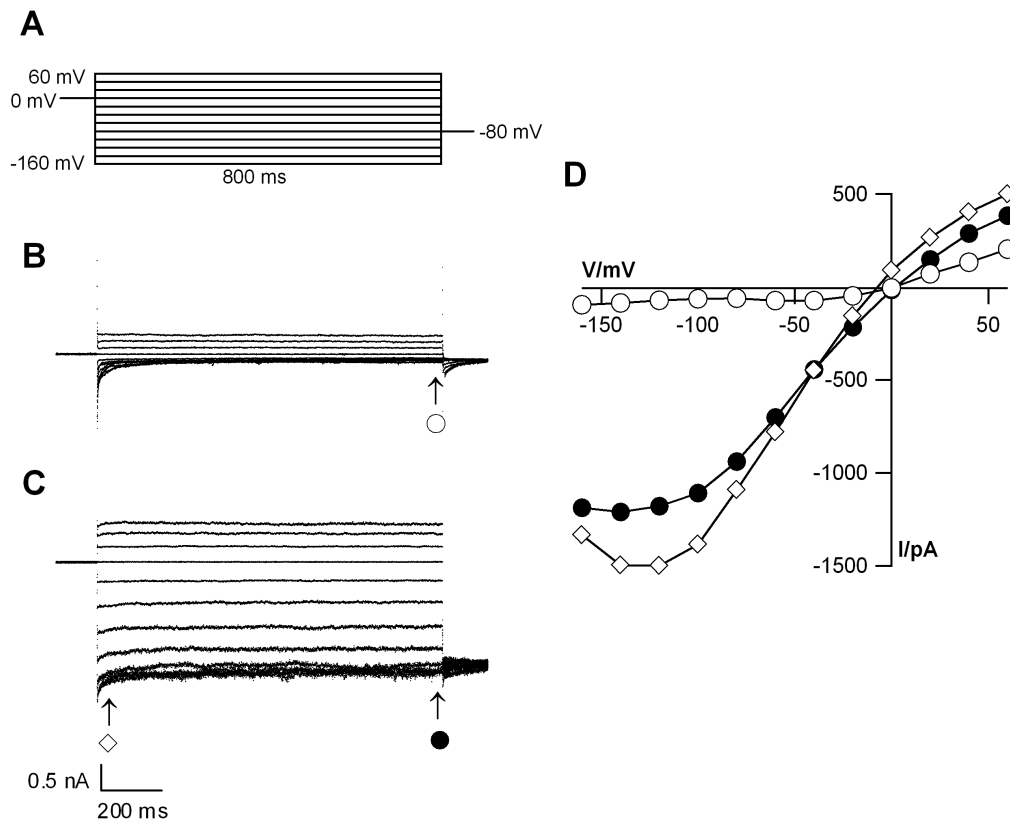
#### 3.1 Heterologe Expression von Kcv in HEK293-Zellen

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass Kcv in der Plasmamembran von Oozyten aus *Xenopus laevis*, in CHO- und in HEK293-Zellen charakteristische Leitfähigkeiten hervorruft (Plugge *et al.* 2000, Gazzarrini *et al.* 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden zur funktionellen Charakterisierung des Kanals vor allem die heterologe Expression in HEK293-Zellen (**h**uman **e**mbrionic **k**idney cells) verwendet. Diese Zellen eignen sich dafür sehr gut, weil ihre endogenen Kanalaktivitäten gut charakterisiert sind (Yu und Kerchner 1998, Jiang *et al.*, 2002); vor allem weisen sie nur geringe endogene K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit auf, so dass die Aktivität von heterolog exprimierten Kanälen gut zu identifizieren ist.

Abbildung 7 zeigt die typische Stromantwort auf ein Standardpulsprotokoll (Abb. 7A) einer HEK293-Zelle, die den Kaliumkanal Kcv exprimierte (Abb. 7C), und einer Kontrollzelle, die nur mit EGFP transfiziert wurde (Abb. 7B). Die Leitfähigkeit wurde mit der Ganzzell *Patch-Clamp* Methode gemessen. Die charakteristische Strom-Spannungskurve (Abb. 7D) von Kcv hat zwischen -60 mV und +20 mV einen weitgehend linearen Verlauf und I<sub>i</sub> (instantaner Strom) sowie I<sub>ss</sub> (stationärer Strom) sind annähernd gleich groß. Bei negativeren bzw. positiveren Spannungen kommt es zu einer Inaktivierung; die Strom-Spannungskurven nähern sich wieder der x-Achse an. Bei sehr negativen Spannungen zeigt der Strom eine träge Inaktivierung. Der stationäre Strom I<sub>ss</sub> ist bei diesen extremen Spannungen kleiner als der instantane Strom I<sub>i</sub>.

Die Expression von Kcv in HEK293 Zellen (n=47) führte bei 68 % zu einer charakteristisch erhöhten Leitfähigkeit gegenüber den Kontrollzellen, die nicht oder nur mit EGFP transfiziert wurden. Die Stromantworten auf die angelegte Referenzspannung bei -100 mV lagen bei den mit Kcv transfizierten Zellen im Mittel bei  $-1064 \pm 417$  pA und bei den Kontrollzellen bei  $-108 \pm 28$  pA.

Es wurden nur Zellen gewertet, bei denen das Verhältnis der Steigungen der Leitfähigkeiten bei negativen Spannungen (-20 bis -60 mV; G<sub>neg</sub>) zu denen bei positiven Spannungen (0 bis 40 mV; G<sub>pos</sub>) größer als 1 war. Dieses Verhältnis lag bei Kcv transfizierten HEK293-Zellen im Mittel bei  $1,5 \pm 0,4$ . Bei EGFP transfizierten HEK293-Zellen wurden Werte zwischen 0,3 und 0,6 ermittelt ( $0,47 \pm 0,13$ ).



### Abb. 7: Heterologe Expression des Kaliumkanal-Gens Kcv in HEK293-Zellen

Stromantworten einer EGFP-transfizierten Kontrollzelle (B) und einer Kcv-transfizierten HEK293-Zelle (C) auf ein Standard-Pulsprotokoll (A). (D) Instantaner Strom  $I_i$  ( $\diamond$ ) und stationärer Strom  $I_{ss}$  ( $\bullet$ ) von HEK293-Zellen, die mit Kcv transfiziert wurden im Vergleich zu einer EGFP-transfizierten Kontrollzelle ( $\circ$ ), als Funktion der Spannung.

Ein Austausch von  $K^+$  gegen  $Na^+$  in der extrazellulären Lösung reduzierte signifikant den Einwärtsstrom bei Kcv-transfizierten Zellen (Abb. 8). Es kam zu einem negativen Shift des Umkehrpotentials von  $-65,5 \pm 9,1$  mV ( $n=4$ ). Das bedeutet, dass  $Na^+$  nicht oder nur wenig transportiert wird; die Kcv-induzierte Leitfähigkeit ist also selektiv für  $K^+$  gegenüber  $Na^+$ .

Das  $P_K^+/P_{Na^+}$ -Permeabilitäts-Verhältnis lag bei 8,2 ( $n=4$ ). Dieses Verhältnis wurde mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung berechnet. Mit Hilfe dieser Gleichung können die Permeabilitäten aller Ionen über einer Membran in Beziehung gesetzt werden. Die Gleichung wurde an das hier vorliegende System angepasst. Dabei wurde die Permeabilität für  $K^+$  gleich 1 gesetzt. Mit dem Faktor  $\alpha$  konnte die relative Permeabilität des Kanals für andere Ionen, in diesem Fall  $Na^+$ , gegenüber  $K^+$  beschrieben werden.

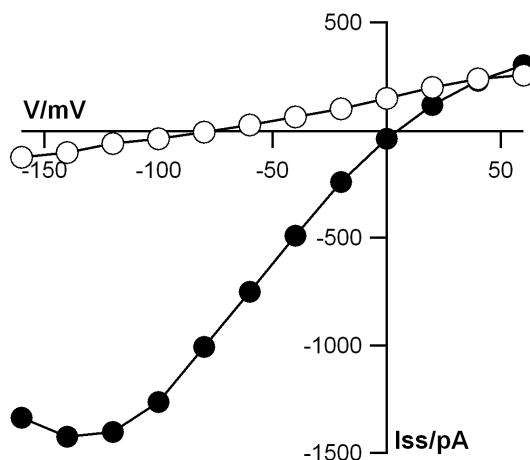
Daraus ergab sich folgende Gleichung:

$$\Delta E_M = -RT/zF * \ln[(c_{(K^+)}^i + c_{(Na^+)}^i * \alpha) / (c_{(K^+)}^a + c_{(Na^+)}^a * \alpha)] \quad (1)$$

$R$  – Gaskonstante;  $T$  – Temperatur;  $z$  – elektrische Ladung des Ions;  $F$  – Faraday-Konstante;  $c_{(K^+)}^i$  bzw.  $c_{(K^+)}^a$  – Kaliumkonzentration innen bzw. außen;  $c_{(Na^+)}^i$  bzw.  $c_{(Na^+)}^a$  – Natriumkonzentration innen bzw. außen,  $\alpha$  – relative Permeabilität ( $P_{Na^+}/P_{K^+}$ )

Eine ähnliche Permeabilität von Kcv für  $K^+$  über  $Na^+$  wurde auch schon in früheren Untersuchungen in HEK293 Zellen ermittelt. Dabei lag das  $P_{K^+}/P_{Na^+}$ -Permeabilitäts-Verhältnis bei 8,4 (n=11) (Moroni *et al.*, 2002).

Bei der Expression von Kcv in Oocyten (siehe 3.9) kam es beim Austausch der extrazellulären Lösung von 50 mM KCl gegen 50 mM NaCl zu einem Shift des Umkehrpotentials von  $-85,0 \pm 4,4$  mV (n=4). Das berechnete  $P_{K^+}/P_{Na^+}$ -Permeabilitäts-Verhältnis lag hier bei 29,5 (n=4). Ein Vergleich der Selektivität für  $K^+$  über  $Na^+$  in den unterschiedlichen Expressionssystemen zeigt, dass Kcv in HEK293-Zellen weniger selektiv für  $K^+$  über  $Na^+$  ist als in Oocyten.



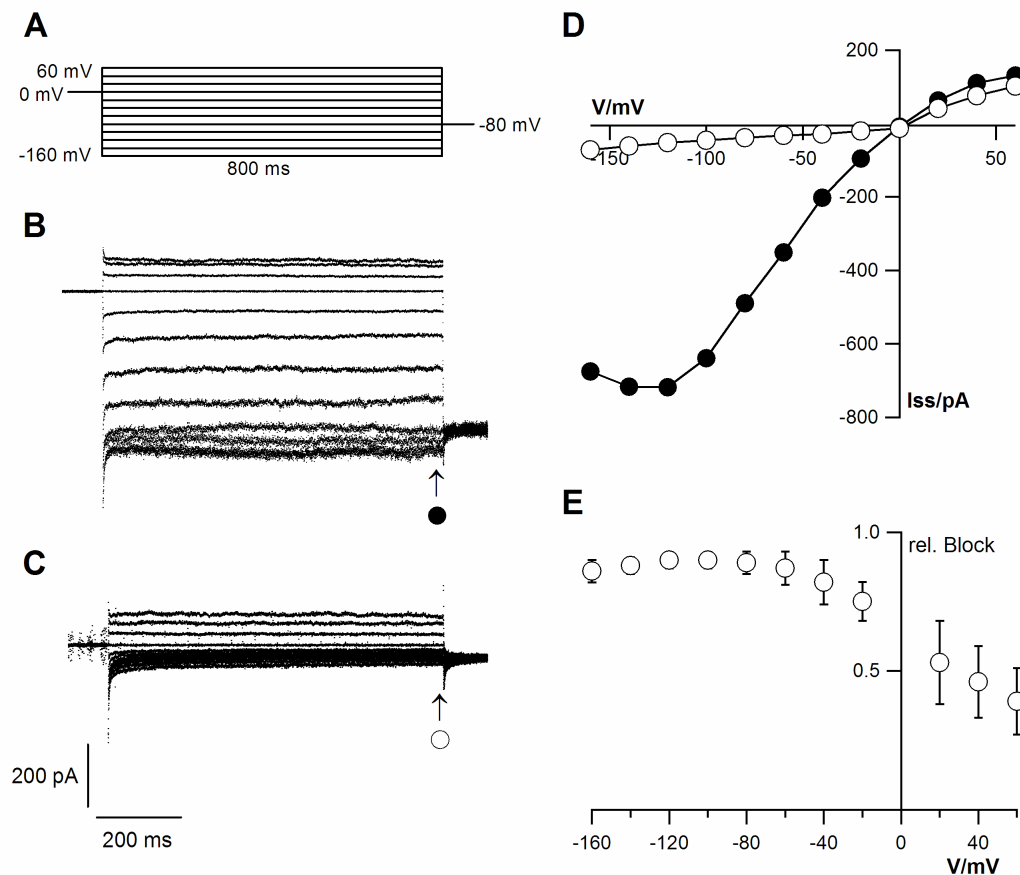
**Abb. 8: Selektivität für  $K^+$  gegenüber  $Na^+$**

Die Strom-Spannungskurven zeigen die Veränderung der stationären Ströme und die Verschiebung des Umkehrpotentials beim Wechsel der extrazellulären Badlösung von 100 mM  $K^+$  (●) auf 100 mM  $Na^+$  (○).

Eine spannungsabhängige Blockierung durch  $Ba^{2+}$  ist ein typisches Merkmal von Kaliumkanälen (Hille 2001). Diese Hemmung beruht auf der Blockierung der Kanalpore durch das zweiwertige Kation, dass bei negativer Membranspannung in die Kanalpore gezogen wird und so den Einwärtsstrom der Kaliumionen blockiert. Auch für Kcv wurde eine steile Span-

nungsabhängigkeit der Blockierung mit  $Ba^{2+}$  in *Xenopus* Oocyten gezeigt (Plugge *et al.*, 2000).

Eine ähnliche spannungsabhängige Inhibierung von Kcv mit  $Ba^{2+}$  wurde auch in HEK293-Zellen gefunden. Hier wurde der hemmende Effekt von 10 mM  $BaCl_2$  im Badmedium vor dem Hintergrund von 100 mM KCl untersucht. In Abbildung 9 ist der Effekt von  $Ba^{2+}$  auf die Kcv-induzierte Leitfähigkeit dargestellt. Bei der Referenzspannung von  $-140$  mV betrug die Hemmung  $85 \pm 10 \%$  gegenüber den Einwärtsströmen in den Zellen ohne  $BaCl_2$ . Abb.9E zeigt, dass Kcv spannungsabhängig durch  $Ba^{2+}$  inhibiert wird. Die Einwärtsströme sind deutlich stärker inhibiert als die Auswärtsströme. Der Übergang zwischen der starken Hemmung der Einwärtsströme und der geringen Hemmung der Auswärtsströme (bei 0 mV) verläuft steil und reflektiert damit eine stringente Spannungsabhängigkeit.



**Abb. 9: Effekt von  $Ba^{2+}$  auf die Leitfähigkeit von Kcv in HEK293-Zellen.**

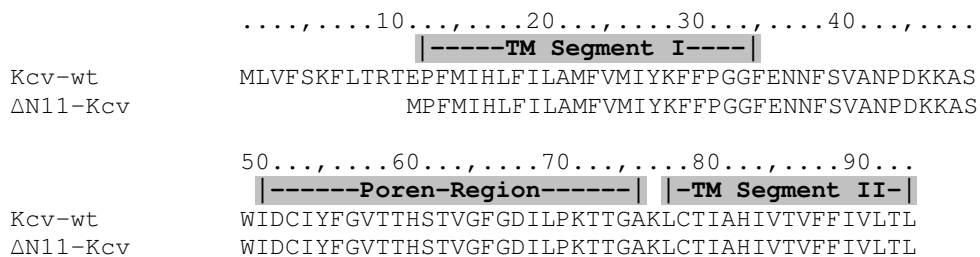
Die Stromantworten transfizierter Zellen bei Spannungspulsen von  $-160$  mV bis  $+60$  mV (**A**) wurden mit der Ganzzell *Patch-Clamp* Technik gemessen. (**B**) Messung mit 100 mM  $K^+$  in der Badlösung und nach Zugabe von 10 mM  $Ba^{2+}$  (**C**). (**D**) Strom-Spannungs-Beziehung der stationären Ströme ( $I_{ss}$ ) aus B und C ohne  $BaCl_2$  ( $\bullet$ ) und mit  $BaCl_2$  ( $\circ$ ). (**E**) Relativer Block der stationären Ströme mit  $Ba^{2+}$ . Die Berechnung der relativen Hemmung erfolgte mit  $1 - I_{ss, Ba} / I_{ss, 0}$ . Angegeben sind rel. Einheiten mit ihren Standardabweichungen ( $n=5$ ).

### 3.2 Der N-Terminus ist essentiell für die Funktion des Kanals

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein Entfernen der ersten 14 Aminosäuren vom Kcv-Protein, zu einem Verlust der Kcv typischen Leitfähigkeit führt. Dies war sowohl in HEK293-Zellen, als auch in *Xenopus* Oocyten (Moroni *et al.*, 2002) zu beobachten. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Verlust an Kcv-Aktivität der  $\Delta N14$ -Kcv-Mutante weder durch eine fehlerhafte Proteinsynthese noch durch unterschiedliche intrazelluläre Verteilung zustande kommt (Moroni *et al.*, 2002).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diesen Verlust an Kcv-Aktivität, der durch Entfernen des N-Terminus entsteht, näher zu untersuchen und mögliche Ursachen für den Verlust der Kcv typischen Leitfähigkeit zu finden.

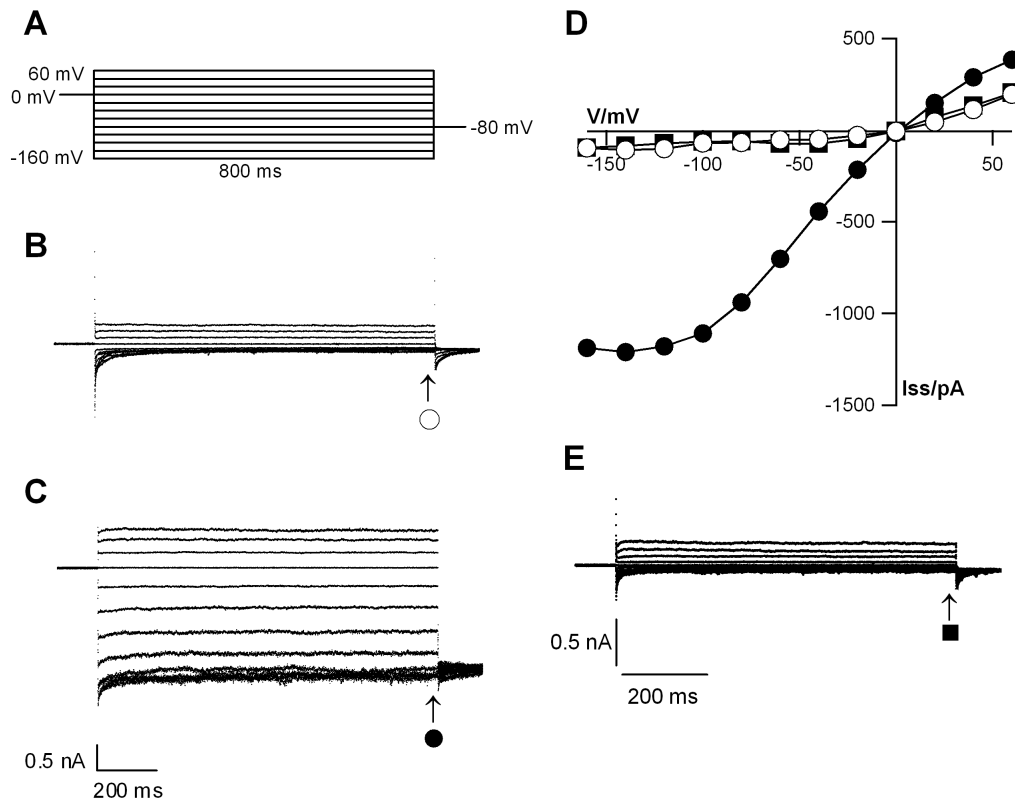
Da bei der  $\Delta N14$ -Mutante nicht nur der N-Terminus, sondern auch die ersten Aminosäuren der ersten Transmembrandomäne entfernt wurden, sollte im folgenden Experiment zunächst überprüft werden, ob eine Kcv-Mutante, bei der lediglich die cytoplasmatische N-terminale Region entfernt wurde, ebenfalls zu einem Verlust an Kcv-Aktivität führt. Dazu habe ich eine Kcv-Mutante hergestellt, in der die Aminosäuren L2-E12 entfernt wurden ( $\Delta N11$ -Kcv). Das Methionin an Position 1 wurde jeweils als N-terminale Aminosäure beibehalten (Abb. 10)



**Abb. 10: Aminosäuresequenzen von Kcv und der  $\Delta N11$ -Kcv-Mutante.**

Das Konstrukt wurde als EGFP-Fusionsprotein in HEK293-Zellen exprimiert und die Leitfähigkeit mit der Ganzzell *Patch-Clamp*-Methode getestet.

Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, zeigt sich kein Unterschied in der Stromantwort zwischen Kontrollzellen, die nur mit EGFP und solchen, die mit  $\Delta N11$ -Kcv transfiziert wurden.



**Abb. 11: Verlust der Kcv-typischen Leitfähigkeit in der  $\Delta N11$ -Kcv-Mutante.**

Stromantworten einer EGFP (B), Kcv (C) und  $\Delta N11$ -Kcv (E) transfizierten HEK293-Zelle auf ein Standard-Pulsprotokoll in 100 mM  $K^+$  in der Badlösung (A). (D) Stationärer Strom  $I_{ss}$  aus B, C und D als Funktion der Spannung (Kcv (●), EGFP-Kontrolle (○) und  $\Delta N11$ -Kcv (■)).

Es kommt zu einem Verlust der Kcv-typischen Leitfähigkeit bei Entfernen der ersten 11 Aminosäuren von der N-terminalen Region des Kcv-Proteins.

Für diesen Verlust an Leitfähigkeit gibt es zwei mögliche Erklärungen: (i) Die  $\Delta N11$ -Kcv-Mutante assoziiert nicht mit der Zellmembran oder (ii) die Mutante bildet keinen funktionellen Kaliumkanal.

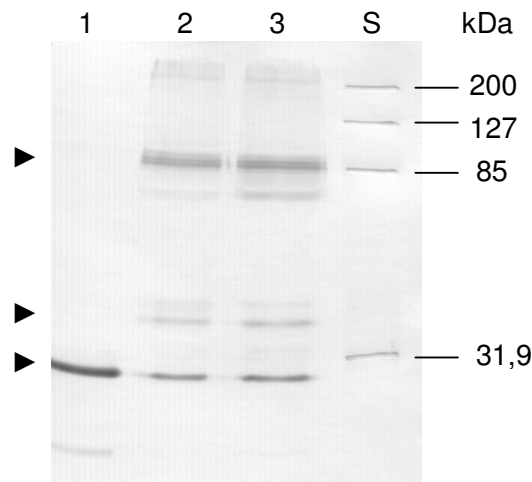
### 3.2.1 Nachweis der $\Delta N11$ -Kcv-Mutante durch Western-Blot-Analyse

Um zu untersuchen ob die  $\Delta N11$ -Kcv-Mutante in HEK293-Zellen exprimiert wird, wurden die Proteine mit Hilfe eines GFP-Antikörpers durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Dazu wurden die transfizierten HEK293-Zellen homogenisiert, nach TCA-Fällung auf ein SDS-Gel aufgetragen und ein Western Blot mit anschließender Immunofärbung durchgeführt. Zur Kontrolle dienten HEK293-Zellen, die mit Kcv transfiziert wurden.

Abbildung 12 zeigt die Immunofärbung unter Verwendung des primären anti-EGFP. Der

GFP-Antikörper erkennt deutlich 3 Proteine sowohl in den Kcv (Spur 2) transfizierten als auch in den  $\Delta$ N11-Kcv (Spur 3) transfizierten Zellen. Die Bande bei 27 kDa entspricht der Molmasse von EGFP. Diese Bande stimmt mit der gefundenen Bande bei EGFP transfizierten HEK293-Zellen überein (Bande 1 in Abb. 12). Die apparente Molmasse bei etwa 37 kDa entspricht rechnerisch dem EGFP-Fusionsprotein Kcv-wt und der  $\Delta$ N11-Kcv-Mutante in der monomeren Form. Bei der Bande bei etwa 85 kDa könnte es sich um eine multimeren Form des Proteins handeln. Auch nach 5 minütigem Kochen der Proben vor der Auftragung auf das SDS-Gel gab es keine Unterschiede zu direkt aufgetragenem Protein.

Funktionelle Kaliumkanäle sind Tetramere (Hille 2001; Doyle *et al.*, 1998). Die tetramere Struktur von Kaliumkanälen erwies sich als stabil, auch nach der Aufreinigung und in Anwesenheit des Detergens SDS (Heginbotham *et al.*, 1997).



**Abb. 12: Nachweis der  $\Delta$ N11-Kcv -Mutante durch Western-Blot-Analyse.**

Elektrophoretische Auftrennung im 12,5 %igem SDS-Gel mit anschließender Immunofärbung mit dem Antikörper anti-GFP. Spur 1 zeigt die EGFP-Kontrolle, Spur 2 Kcv und Spur 3 die  $\Delta$ N11-Kcv -Mutante. Die Pfeile markieren die Position von EGFP (27 kDa), der monomeren (37 kDa) und multimeren Form (ca. 85 kDa) der Fusionsproteine Kcv und der  $\Delta$ N11-Kcv-Mutante. Spur S zeigt den Proteinstandard mit molekularen Massen.

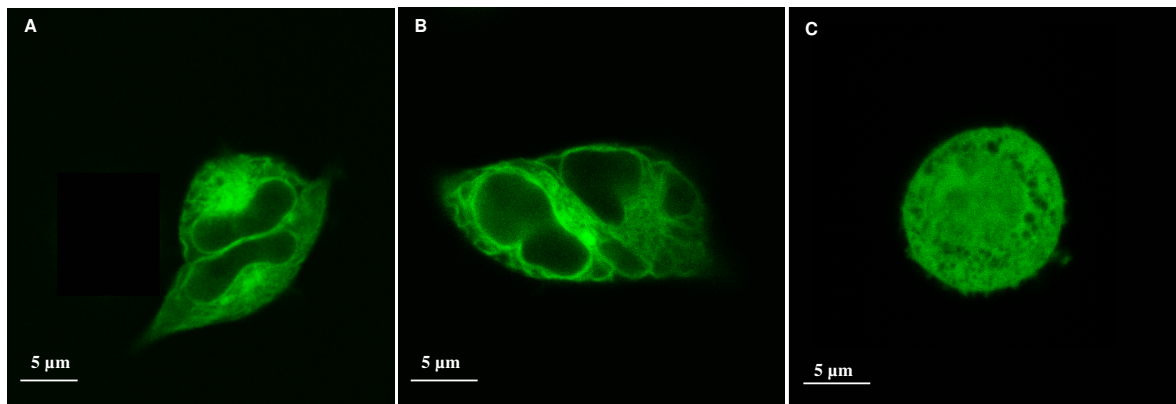
Auch bei der Expression von Kcv in *Pichia pastoris* wurde in Western-Blot-Analysen neben Banden mit der monomeren Masse von Kcv auch Banden mit der Masse des tetrameren Proteins markiert (Doktorarbeit Cinzia Pagliuca). Daher kann es sich bei der 85 kDa-Bande um ein Kcv-Dimer handeln. Diese Bande wurde jedoch sowohl in Kcv- als auch in  $\Delta$ N11-Kcv-transfizierten HEK293-Zellen gefunden. Demnach spielt der N-Terminus keine essentielle Rolle bei der Tetramerisierung des Kcv-Proteins.

### 3.2.2 Zelluläre Verteilung der $\Delta N11$ -Kcv-Mutante in HEK293-Zellen

Die Western-Blot-Analyse zeigt, dass die beiden Proteine Kcv und  $\Delta N11$ -Kcv gleich stark in HEK293-Zellen exprimiert werden. Demnach ist auch in diesem Fall die Proteinsynthese nicht dafür verantwortlich, dass die  $\Delta N11$ -Kcv-Mutante nicht mehr funktionell ist.

Um zu untersuchen, ob der Verlust der Kcv-typischen Leitfähigkeit bei der  $\Delta N11$ -Kcv-Mutante durch eine fehlende Oberflächenexpression des Proteins zustande kommt, wurde die Verteilung von Fluoreszenzsignal in transfizierten HEK293-Zellen mit der Confokalen Laser Scanning Mikroskopie untersucht. Die Fluoreszenz wurde nach Anregung durch monochromatisches Laserlicht (488 nm) in der Äquatorialebene der Zellen detektiert.

In Abbildung 13 sieht man die Fluoreszenzverteilung von EGFP-Fusionsproteinen des Kaliumkanals Kcv (Abb. 13A) und der  $\Delta N11$ -Kcv-Mutante (Abb. 13B). In HEK293-Zellen, die mit Kcv oder  $\Delta N11$ -Kcv transfiziert waren, akkumulierte die Fluoreszenz in netzwerkartigen, tubulären Strukturen. Um den Kern ist ein geschlossener fluoreszierender perinukleärer Ring zu erkennen. Bei Zellen, die nur mit EGFP alleine transfiziert wurden (Abb. 13C), war die Fluoreszenz sowohl im Kern als auch im Cytoplasma lokalisiert, was für ein lösliches Protein wie EGFP zu erwarten ist.



**Abb. 13: Zelluläre Verteilung von Kcv und der  $\Delta N11$ -Kcv-Mutante**

EGFP-Fluoreszenzverteilung aufgenommen am Confokal-Mikroskop von HEK293-Zellen 2 Tage nach der Transfektion mit (A) Kcv, (B)  $\Delta N11$ -Kcv und (C) EGFP.

Die Ergebnisse zeigen, dass der N-Terminus von Kcv essentiell für die Funktion des Kanals ist. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust an Kcv-Aktivität der  $\Delta N11$ -Kcv-Mutante, weder durch eine fehlerhafte Proteinsynthese noch durch unterschiedliche intrazelluläre Verteilung zustande kommt. Jedoch konnte mit diesen Methoden keine eindeutige Lokalisation weder vom wt Kanal noch von der Mutante in der Plasmamembran gezeigt werden. Als mögliche Ursache für die Fehlfunktion der Mutante kommt somit immer noch eine fehlerhafte

Oberflächenexpression des Proteins in Frage. Die identische Fluoreszenzverteilung, der beiden Konstrukte Kcv und  $\Delta N11$ -Kcv-Mutante, mit netzwerkartiger Struktur und einem geschlossenen Ring unmittelbar um den Kern spricht dafür, dass auch die Mutante in Membranen integriert wird und dort nicht funktionell ist.

### 3.3 Die ersten 7 Aminosäuren sind nicht essentiell für die Funktionalität von Kcv

Um die Rolle des N-Terminus genauer zu untersuchen, wurde eine unterschiedliche Anzahl an Aminosäuren vom N-Terminus entfernt und diese Kcv-Mutanten auf ihre Funktionalität hin untersucht.

In Abbildung 14 sind die unterschiedlichen Konstrukte mit ihrer Aminosäuresequenz dargestellt. Das Methionin an Position 1 wurde als N-terminale Aminosäure beibehalten.

	.....10.....20.....30.....40.....
Kcv-wt	MLVFSKFLTRTEPFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS
$\Delta N3$ -Kcv	MSKFLTRTEPFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS
$\Delta N7$ -Kcv	MTRTEPFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS
$\Delta N8$ -Kcv	MRTEPFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS
$\Delta N9$ -Kcv	MTEPFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS

**Abb. 14: Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen Kcv-Mutanten mit verkürzten N-Termini.**

Auch diese Konstrukte wurden als EGFP-Fusionsproteine in HEK293-Zellen exprimiert und die Leitfähigkeit mit der Ganzzell *Patch-Clamp* Methode getestet.

Abbildung 15 zeigt die typischen Stromantworten auf ein Standard-Pulsprotokoll einer  $\Delta N7$ -Kcv (Abb. 15D) und  $\Delta N8$ -Kcv (Abb. 15E) transfizierten HEK293 Zelle im Vergleich zu einer mit Kcv (Abb. 15C) und einer nur mit EGFP (Abb. 15B) transfizierten HEK293-Zelle.

In diesen Experimenten stellte sich heraus, dass ein Entfernen der ersten 7 Aminosäuren vom Kcv-Protein keine Auswirkung auf die Funktion des Kanals hat. Die Leitfähigkeiten der  $\Delta N3$ -Kcv- und der  $\Delta N7$ -Kcv-Mutanten unterscheiden sich nicht wesentlich vom Wildtyp (Abb. 15). Die Mutante  $\Delta N7$ -Kcv zeigte die gleiche Selektivität für  $K^+$  über  $Na^+$  und die gleiche Sensitivität zu dem Kaliumkanalblocker  $Ba^{2+}$  wie Kcv (Tab.2).

	Ba <sup>2+</sup> -Block des Einwärtsstroms bei -140 mV	Verschiebung des Umkehrpotentials K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>
Kcv	85,0 % ± 10,6 % (n=6)	65,5 mV ± 9,1 mV (n=4)
ΔN7-Kcv	84,0 % ± 9,2 % (n=7)	60,3 mV ± 21,4 mV (n=3)

**Tab. 2: K<sup>+</sup>-Selektivität und Ba<sup>2+</sup>-Block von Kcv und ΔN7-Kcv**

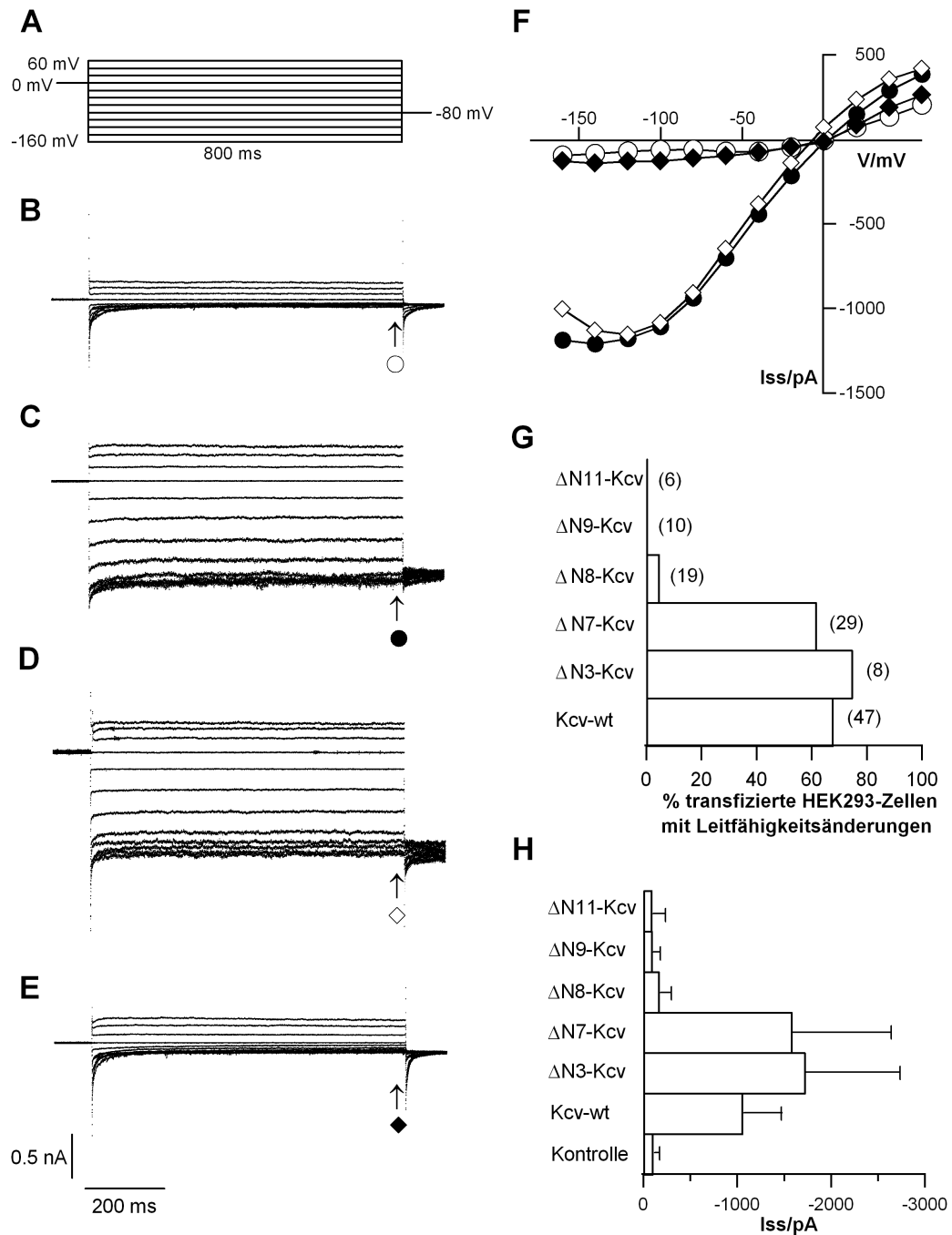
Inhibition durch Ba<sup>2+</sup> der Kcv und ΔN7-Kcv induzierten Einwärtsströme bei der Referenzspannung -140 mV und der negative Shift des Umkehrpotentials bei Austausch von K<sup>+</sup> gegen Na<sup>+</sup> in der Badlösung. Angegeben sind die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen (n=Anzahl der untersuchten HEK293-Zellen).

Jedes weitere Verkürzen der N-terminalen Domäne führte jedoch zu einer drastischen Reduktion bis hin zu einem kompletten Verlust der Kaliumleitfähigkeit.

Bei der Transfektion von HEK293-Zellen mit der ΔN8-Kcv-Mutante zeigte nur eine von 19 Zellen bei 7 unabhängigen Transfektionen eine Kcv-typische Erhöhung der Leitfähigkeit gegenüber EGFP transfizierten Kontrollzellen. Bei der ΔN9-Kcv-Mutante zeigte keine transfizierte Zelle eine signifikante Erhöhung der Leitfähigkeit. In Abbildung 15G ist die relative Häufigkeit gezeigt, mit der Kcv-typische Leitfähigkeiten in HEK293-Zellen nach der Transfektion mit den Kcv-Mutanten auftraten.

In Abbildung 15H ist ferner die mittlere Stromantwort der stationären Ströme bei der Referenzspannung -140 mV der einzelnen Mutanten, der Kontrolle und des Wildtyps dargestellt. Die Mutanten ΔN3-Kcv und ΔN7-Kcv unterscheiden sich im mittleren Strom nicht signifikant von Kcv. Die Transfektion von HEK293-Zellen mit den Kcv-Mutanten ΔN8-Kcv und ΔN9-Kcv führten nur selten bzw. gar nicht zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit gegenüber EGFP transfizierten Kontrollzellen, was sich auch im mittleren Strom widerspiegelt.

Die Studien an Kcv-Mutanten mit verkürzter N-terminaler Domäne zeigen, dass die ersten 7 Aminosäuren von Kcv nicht essentiell für die Kanalfunktion sind. Jedes weitere Verkürzen jedoch führt zu einer drastischen Reduktion bis hin zu einem Verlust der Kcv-typischen Leitfähigkeit.



**Abb. 15: Heterologe Expression der Kcv-Mutanten mit verkürzten N-Termini**

Stromantworten einer  $\Delta N7$ -Kcv (**D**) und  $\Delta N8$ -Kcv (**E**) transfizierten HEK293-Zelle im Vergleich zu einer mit Kcv (**C**) und einer nur mit EGFP (**B**) transfizierten HEK293-Zelle, auf ein Standardpulsprotokoll (**A**). (**F**) Strom-Spannungs-Beziehungen der stationären Ströme  $I_{ss}$  aus B, C, D und E (Kcv (●), EGFP-Kontrolle (○),  $\Delta N7$ -Kcv (◇) und  $\Delta N8$ -Kcv (◆)). (**G**) Relative Häufigkeit von erhöhten Leitfähigkeiten in HEK293-Zellen nach der Transfektion mit Kcv und den Kcv-Mutanten. (**H**) Mittlere Stromantwort bei der Referenzspannung -140 mV mit ihren Standardabweichungen.

### 3.4 Austausch der ersten Aminosäure in der $\Delta$ N7-Kcv-Mutante

Um zu untersuchen, ob der spezifische Charakter der ersten Aminosäure (nach Methionin) in der  $\Delta$ N7-Kcv-Mutante für die Funktionalität des Kanals wichtig ist, habe ich verschiedene Mutanten hergestellt, in denen ich zunächst die Aminosäure Threonin an Position 9 in der  $\Delta$ N7-Kcv-Mutante gegen Alanin und Serin ausgetauscht habe. In Abbildung 16 sind die unterschiedlichen Konstrukte mit ihrer Aminosäuresequenz dargestellt.

```

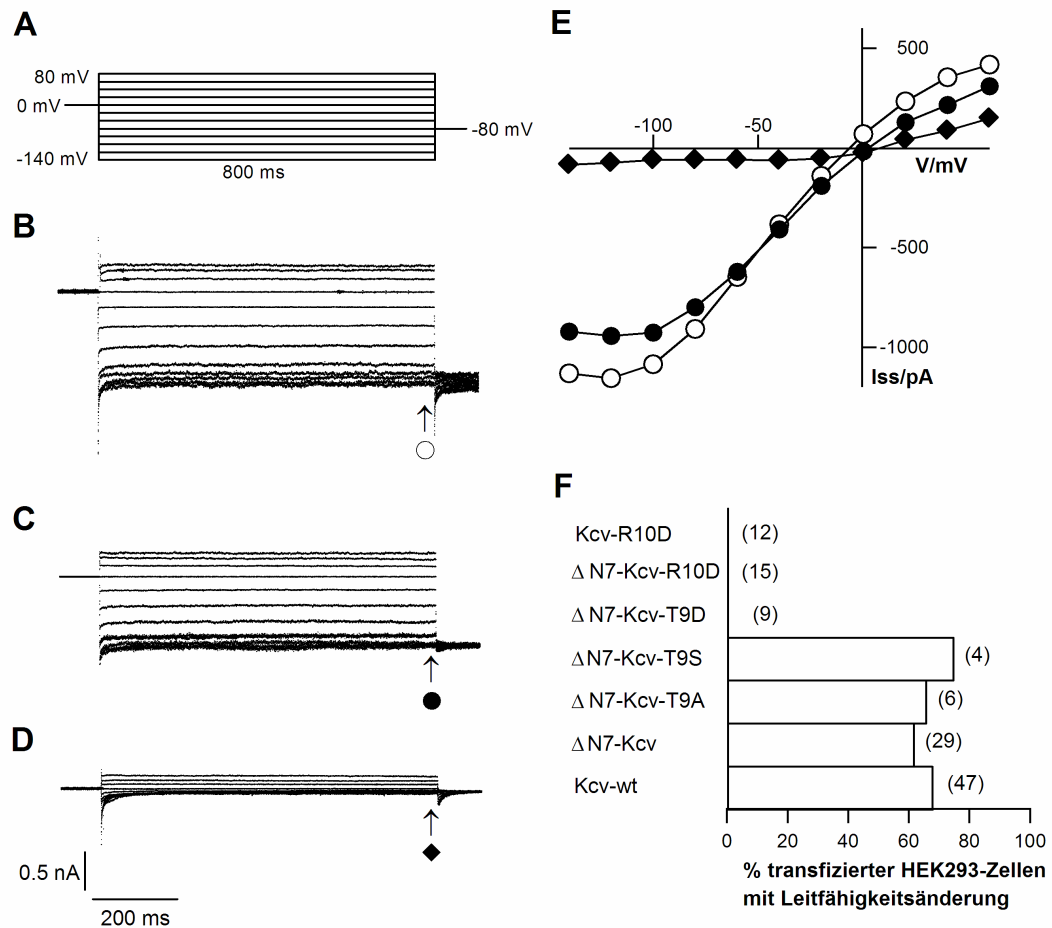
          .....10.....20.....30.....40.....
Kcv-wt      MLVFSKFLTRTEPFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS
 $\Delta$ N7-Kcv    MTRTEPFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS
 $\Delta$ N7-Kcv-T9A  MARTEPFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS
 $\Delta$ N7-Kcv-T9S  MSRTEPFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS
 $\Delta$ N7-Kcv-T9D  MDRTEPFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS
 $\Delta$ N7-Kcv-R10D MTDTEPFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS
Kcv-R10D    MLVFSKFLTDTEPFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNFSVANPDKKAS

```

**Abb. 16: Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen Kcv-Mutanten**

Auch diese Konstrukte wurden als EGFP-Fusionsproteine in HEK293-Zellen exprimiert. Ein Test auf die Kanalfunktion dieser Mutanten in HEK293-Zellen zeigte, dass es keinen erkennbaren Unterschied zu der  $\Delta$ N7-Kcv-Mutante und dem Kcv-wt gibt. In Abbildung 17 ist die Stromantwort und Strom-Spannungs-Beziehung der  $\Delta$ N7-Kcv-T9S-Mutante dargestellt. Auch bei einem Austausch von Threonin gegen Alanin in der  $\Delta$ N7-Kcv-Mutante ( $\Delta$ N7-Kcv-T9A) kommt es im Vergleich zu Kcv Wildtyp und  $\Delta$ N7-Kcv-Mutante zu keiner Änderung in der Stromantwort und der Strom-Spannungsbeziehung. Die relative Häufigkeit, mit der Kcv-typische Leitfähigkeiten in HEK293-Zellen nach der Transfektion mit den Kcv-Mutanten auftraten, unterschied sich nicht signifikant (Abb. 17F). Der Charakter der Aminosäure Threonin an Position 9 im Kcv Protein ist somit nicht essentiell für die Kanalfunktion.

Ein Austausch gegen eine negativ geladene Aminosäure an dieser Position wurde jedoch nicht toleriert. Bei einem Ersetzen der Aminosäure Threonin (T9) gegen die negativ geladene Aminosäure Aspartat (D) (Abb. 17) kam es zu einem Verlust der Kanalleitfähigkeit. Bei der Transfektion von HEK293-Zellen mit der  $\Delta$ N7-Kcv-T9D-Mutante zeigte keine Zelle eine Kcv-typische Erhöhung der Leitfähigkeit gegenüber EGFP-transfizierten Kontrollzellen (Abb. 17F). Es scheint somit, dass der Ladungszustand dieser N-terminalen Domäne wichtig für die Funktionalität des Kanals ist.



### Abb. 17: Heterologe Expression der Kcv-Mutanten in HEK293-Zellen

Stromantworten einer  $\Delta$ N7-Kcv (**B**),  $\Delta$ N7-Kcv-T9S (**C**) und  $\Delta$ N7-Kcv-R10D (**D**) transfizierten HEK293-Zelle auf ein Standardpulsprotokoll (**A**). (**E**) Strom-Spannungs-Beziehungen der stationären Ströme  $I_{ss}$  aus B, C und D ( $\Delta$ N7-Kcv (○),  $\Delta$ N7-Kcv-T9S (●) und  $\Delta$ N7-Kcv-R10D (◆)). (**F**) Relative Häufigkeit von erhöhten Leitfähigkeiten in HEK293-Zellen nach der Transfektion mit Kcv und den Kcv-Mutanten.

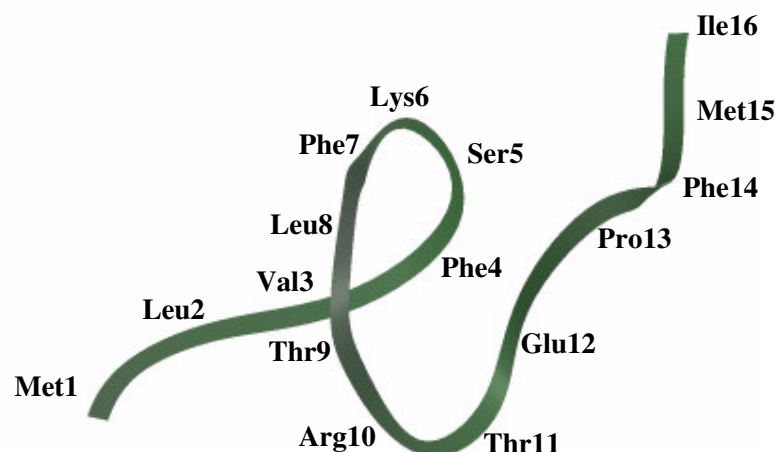
Um die Rolle der Ladungen in der N-terminalen Region von Kcv noch genauer zu untersuchen, wurde sowohl in der  $\Delta$ N7-Kcv-Mutante als auch im Kcv-wt die positiv geladene Aminosäure Arginin (R) an Position 10 gegen die negativ geladene Aminosäure Aspartat (D) ausgetauscht (Abb. 17). Bei beiden Mutanten kam es zu einem kompletten Verlust der Kcv-typischen Leitfähigkeit. Abbildung 17D zeigt die Stromantwort einer  $\Delta$ N7-Kcv-R10D transfizierten HEK293-Zelle.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine zusätzliche negative Ladung sowohl in der  $\Delta$ N7-Kcv-Mutante, als auch im wt-Kcv nicht toleriert wird und zu einem Verlust der Kanalleitfähigkeit führt.

### 3.5 Position und Struktur der N-terminalen Domäne von Kcv

Die Kristallstruktur von dem bakteriellen Kaliumkanal KirBac1.1 hat eine amphipatische  $\alpha$ -helikale Domäne aufgedeckt, welche vor der ersten Transmembrandomäne (TM1) liegt und parallel zur Cytoplasma-Membran-Grenzschicht verläuft (Kuo *et al.*, 2003). Es wird vermutet, dass diese Domäne eine Rolle bei der Verankerung des Kanals in der Membran spielt (Domenne *et al.*, 2004). Homologie Modellierung von Kcv an der Struktur von KirBac1.1 zeigt, dass der virale Kaliumkanal Kcv eine Struktur aufweist, die ähnlich zu dem bakteriellen Kanal ist (Abb. 5) (Gazzarrini *et al.*, 2004). Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeiten zwischen dem bakteriellen  $K^+$ -Kanal und Kcv, kann vermutet werden, dass auch der kurze cytoplasmatische N-Terminus von Kcv in der Cytoplasma-Membran-Grenzschicht verläuft und eine Rolle bei der Verankerung des Proteins in der Membran spielt.

Um einige weitere strukturelle Informationen über die N-terminale Region des viralen Kaliumkanals Kcv zu bekommen wurde ein synthetisches Peptid der ersten 15 Aminosäuren des Kcv Proteins hergestellt (M1 bis I16). Die dreidimensionale Struktur dieses Peptids wurde mit Hilfe der NMR-Spektroskopie an einem 700 MHz Spektrometer in der Arbeitsgruppe von Prof. Schwalbe an der Universität Frankfurt ermittelt. Die aus den NMR-spektroskopischen Daten erhaltene Struktur der N-terminalen Domäne des Kcv-Proteins gibt Hinweise auf eine Loopbildung (Abb. 18).



**Abb. 18: Mögliche Struktur von der N-terminalen Domäne des Kcv-Proteins ermittelt aus NMR-spektroskopischen Daten** (durchgeführt von der Arbeitsgruppe Prof. Schwalbe, Universität Frankfurt).



### 3.6 Austausch der Aminosäure Prolin an Position 13 im Kcv-Protein

Für eine Positionierung der N-terminalen Region parallel zur Membran-Cytoplasma-Grenzschicht muss das Protein zwischen der N-terminalen Helix und der ersten Transmembrandomäne abknicken. Die ideale Aminosäure, um solch einen Winkel zu formen, ist Prolin. Prolinreste zerstören die reguläre Struktur von Helices durch Bildung eines Knicks zwischen den anliegenden Segmenten (Cordes *et al.*, 2002). Prolinreste sind weit verbreitet in Transmembranhelices von Transportproteinen und scheinen im besonderen Fall von Ionenkanälen eine funktionelle Rolle im Gating-Mechanismus zu spielen (Tieleman *et al.*, 2001; Labro *et al.*, 2003). Bei der Untersuchung der Verteilung von Prolinresten in Transmembranhelices wurde eine Bevorzugung der terminalen und zentralen Region gefunden (Ulmschneider und Sansom, 2001; Cordes *et al.*, 2002).

Die Strukturvorhersage von Kcv zeigt, dass sich Prolin an Position 13 im Kanalprotein an der richtigen Stelle, nämlich vor dem prognostizierten Beginn der Transmembranhelix, befindet, um solch einen Winkel zu bilden. Der entsprechende Knick in der Proteinstruktur wird auch von der NMR-Struktur vorhergesagt.

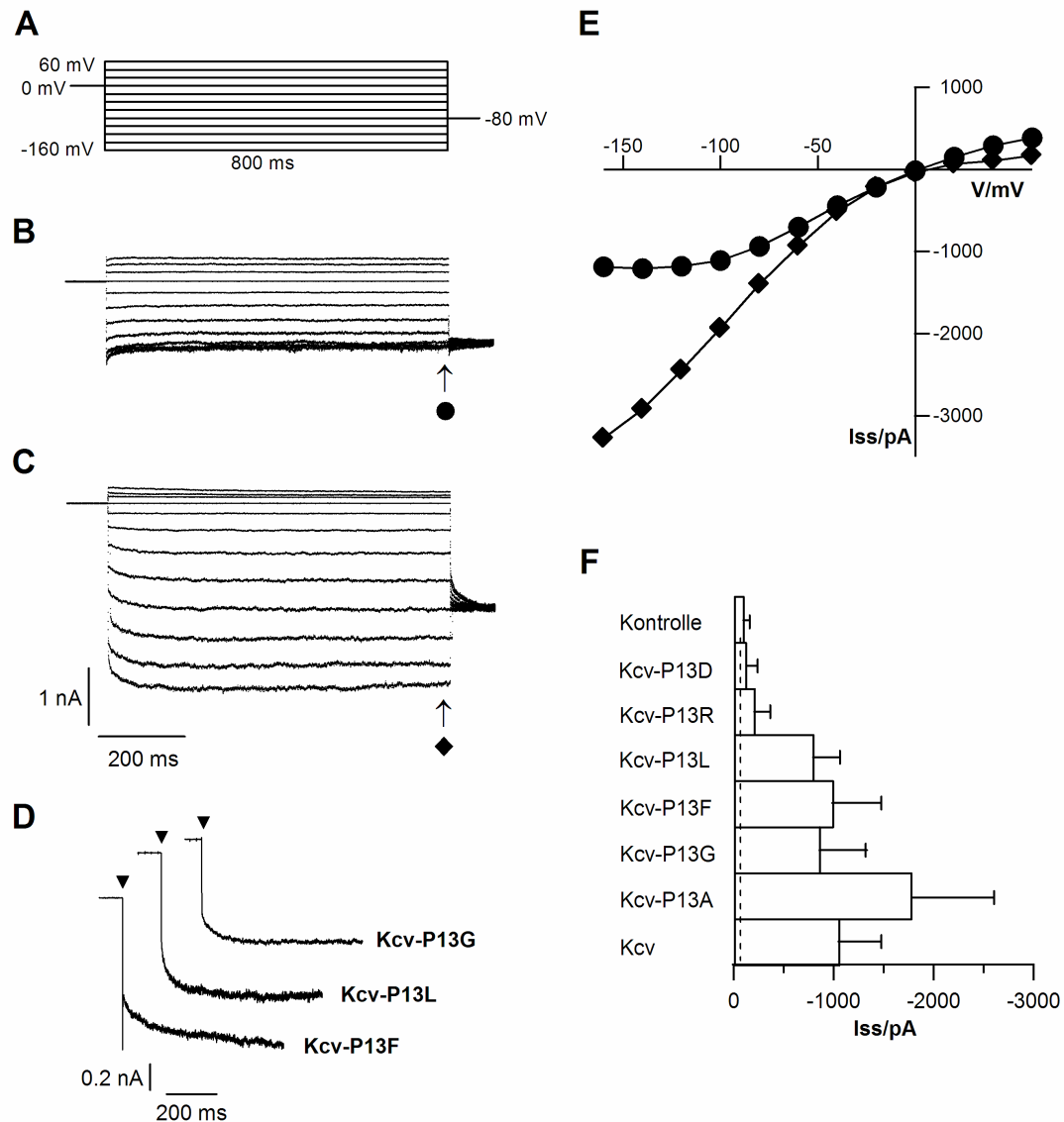
Um die Rolle des Prolins an dieser Position zu untersuchen, wurde diese Aminosäure gegen Aminosäuren mit unterschiedlichem Charakter ausgetauscht. In Abbildung 20 sind die Kcv-Mutanten mit ihrer Aminosäuresequenz dargestellt. Die Mutanten wurden als EGFP-Fusionsproteine in HEK293-Zellen exprimiert und die Leitfähigkeit mit der Ganzzell *Patch-Clamp* Methode getestet.

	.....10.....20.....30.....40.....
Kcv-wt	MLVFSKFLTRTEPFMIHLFILAMFVMIYKFFPPGGFENNFSVANPDKKAS
Kcv-P13A	MLVFSKFLTRTEAFMIHLFILAMFVMIYKFFPPGGFENNFSVANPDKKAS
Kcv-P13G	MLVFSKFLTRTEGFMIHLFILAMFVMIYKFFPPGGFENNFSVANPDKKAS
Kcv-P13L	MLVFSKFLTRTELFMIHLFILAMFVMIYKFFPPGGFENNFSVANPDKKAS
Kcv-P13F	MLVFSKFLTRTEFFMIHLFILAMFVMIYKFFPPGGFENNFSVANPDKKAS
Kcv-P13D	MLVFSKFLTRTEDFMIHLFILAMFVMIYKFFPPGGFENNFSVANPDKKAS
Kcv-P13R	MLVFSKFLTRTERFMIHLFILAMFVMIYKFFPPGGFENNFSVANPDKKAS

**Abb. 20: Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen Kcv-P13-Mutanten.**

#### 3.6.1 Austausch von Prolin an Position 13 gegen ungeladene Aminosäuren

Bei einem Austausch von Prolin gegen die Aminosäure Alanin, die Aminosäure mit der höchsten Präferenz für die Ausbildung einer Helix (O'Neil und DeGrado, 1990), kommt es zu einer interessanten Stromantwort (Abb. 21D). Bei Sprüngen auf Testspannungen negativer als -40 mV kommt es zu einem biphasischen Stromverlauf. Aufgesetzt auf einen instantanen Strom zeigt sich eine zeit- und spannungsabhängige Komponente. In der Strom-Spannungs-Beziehung sieht man (Abb. 21F), dass der stationäre Strom durch Kcv-wt eine spannungsabhängige Abnahme bei negativen Spannungen zeigt. Der Strom durch die Kanalmutante Kcv-P13A jedoch ist annähernd linear.



### Abb. 21: Heterologe Expression der Kcv-P13-Mutanten in HEK293-Zellen

Stromantworten einer Kcv (B) und Kcv-P13A (C) transfizierten HEK293-Zelle auf ein Standardpulsprotokoll (A). (D) Stromantwort der Kcv-P13G-, Kcv-P13L- und Kcv-P13F-Mutante bei einem Spannungssprung von 0 mV auf -160 mV. (E) Strom-Spannungs-Beziehungen der stationären Ströme  $I_{ss}$  aus B und C (Kcv (●) und Kcv-P13A (◆)). (F) Mittlere Stromantwort bei der Referenzspannung -140 mV mit ihren Standardabweichungen.

Um diese Spannungsabhängigkeit genauer zu untersuchen, habe ich die Kurven mit einem Polynom 4. Grades gefittet und von dieser Funktion die 1. Ableitung gebildet. Die Ableitung einer Funktion informiert über deren Steigung und beschreibt somit die momentane Veränderungsrate der Funktion. Ist die Funktion steigend ist die erste Ableitung positiv. Ist die momentane Änderungsrate der Funktion gleich Null, ist die erste Ableitung gleich Null. Ein Vergleich der 1. Ableitung der mittleren instantanen Ströme der Kcv-P13A-Mutante und des



Ein biphasischer Stromverlauf, wie bei der Mutante Kcv-P13A, fand sich auch, wenn Prolin gegen Phenylalanin und Leucin ausgetauscht wurde; Aminosäuren mit einer niedrigeren Präferenz für die Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix (O'Neil und DeGrado, 1990) (Abb. 21). Auch bei einem Austausch von Prolin an Position 13 gegen Glycin, eine Aminosäure, die eine  $\alpha$ -helikale Konfiguration eher destabilisiert und somit die Rolle des Prolins in der Struktur des Proteins übernehmen könnte (Lu *et al.*, 2001), führte zu Kanälen mit der gleichen Charakteristik wie die Kcv-P13A-Mutante (Abb. 21E).

In Abbildung 21G ist die mittlere Stromantwort der stationären Ströme der einzelnen Mutanten, der Kontrolle und des Wildtyps auf einen Spannungssprung von 0 mV zu -140 mV dargestellt. Die Mutanten Kcv-P13G, Kcv-P13L und Kcv-P13F unterscheiden sich im mittleren Strom nicht signifikant von Kcv-wt. Jedoch zeigt die Kcv-P13A-Mutante einen signifikant höheren mittleren Strom als der Kcv-wt (Wahrscheinlichkeit eines ungepaarten t-Tests mit zweiseitiger Verteilung (0,04)).

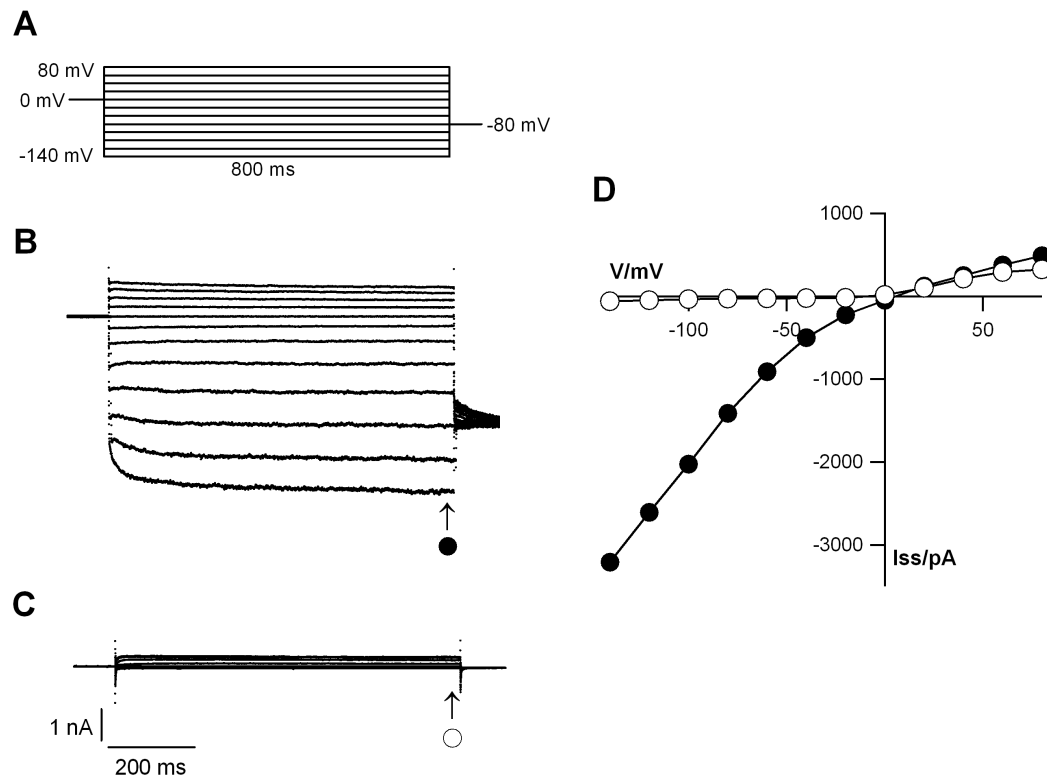
Um die Auswirkungen dieser Mutation auf generelle Eigenschaften der Kanalfunktion zu testen, wurde die  $K^+$ -Selektivität und der Barium-Block in der Kcv-P13A-Mutante untersucht.

In Abbildung 24 ist der Effekt von einer Zugabe von 10 mM  $Ba^{2+}$  zum Standard Badmedium auf die Kcv-P13A induzierte Leitfähigkeit dargestellt. Bei der Referenzspannung von -140 mV betrug die Hemmung  $89,7 \pm 9,4 \%$  gegenüber den Einwärtsströmen in den Zellen gemessen in Abwesenheit von  $BaCl_2$  (Tab. 3). Damit unterscheidet sich der Barium-Block nicht signifikant von dem Effekt von  $Ba^{2+}$  auf die Kcv induzierte Leitfähigkeit.

	$Ba^{2+}$ -Block des Einwärtsstroms bei -140 mV	Verschiebung des Umkehrpotentials $K^+/Na^+$
Kcv	$85,0 \% \pm 10,6 \% (n=6)$	$65,5 \text{ mV} \pm 9,1 \text{ mV} (n=4)$
Kcv-P13A	$89,7 \% \pm 9,4 \% (n=3)$	$90,4 \text{ mV} \pm 7,3 \text{ mV} (n=4)$

**Tab. 3:  $K^+$ -Selektivität und  $Ba^{2+}$ -Block von Kcv und Kcv-P13A**

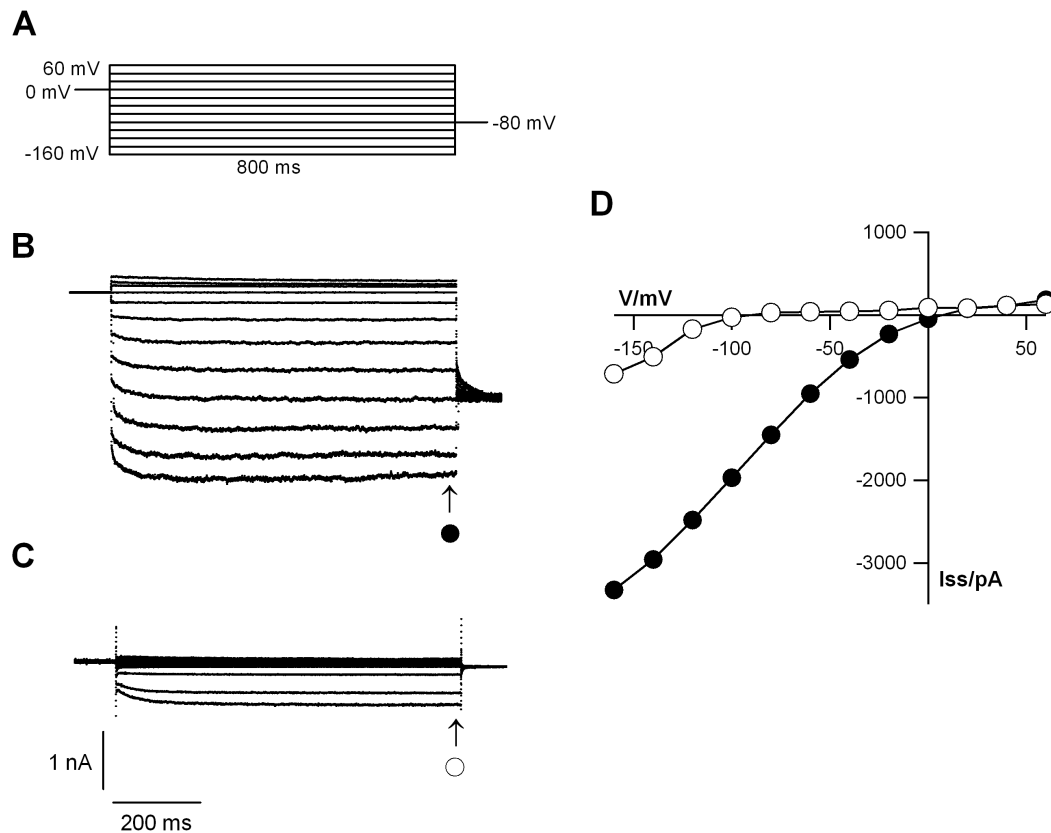
Block nach Zugabe von 10 mM  $Ba^{2+}$  zu der Standard-Badlösung der Kcv und Kcv-P13A induzierten Einwärtsströme bei der Referenzspannung -140 mV und negativer Shift des Umkehrpotentials bei Austausch von  $K^+$  gegen  $Na^+$  in der Badlösung. Angegeben sind die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen (n=Anzahl der untersuchten HEK293-Zellen).



**Abb. 24: Effekt von Ba<sup>2+</sup> auf die Leitfähigkeit von Kcv-P13A in HEK293-Zellen.**

Die Stromantworten transfizierter Zellen bei Spannungspulsen von -140 mV bis + 60 mV (**A**) wurden mit der Ganzzell *Patch-Clamp*-Technik gemessen. (**B**) Messung mit 100 mM K<sup>+</sup> in der Badlösung und nach Zugabe von 10 mM Ba<sup>2+</sup> (**C**). (**D**) Strom-Spannungs-Beziehung der stationären Ströme (I<sub>ss</sub>) aus B und C ohne BaCl<sub>2</sub> (●) und mit BaCl<sub>2</sub> (○).

Ein Austausch von K<sup>+</sup> gegen Na<sup>+</sup> in der extrazellulären Lösung reduzierte signifikant den Einwärtsstrom bei Kcv-P13A transfizierten Zellen (Abb. 24). Es kommt zu einem negativen Shift des Umkehrpotentials von  $90,4 \pm 7,3$  mV (n=4). Damit ist der negative Shift des Umkehrpotentials, bei komplettem Austausch von K<sup>+</sup> gegen Na<sup>+</sup> in der Badlösung, in der Kcv-P13A-Mutante mehr ausgeprägt als im Wildtyp (Tab. 3). Dies zeigt, dass Kcv-P13A eine erhöhte Selektivität für K<sup>+</sup> zu Na<sup>+</sup> aufweist. Ein Vergleich des P<sub>K<sup>+</sup></sub>/P<sub>Na<sup>+</sup></sub>-Permeabilitäts-Verhältnisses verdeutlicht dies. Bei Kcv lag das P<sub>K<sup>+</sup></sub>/P<sub>Na<sup>+</sup></sub>-Permeabilitäts-Verhältnis bei 8,2 (n=4). Bei Kcv-P13A ergab sich ein Verhältnis (P<sub>K<sup>+</sup></sub>/P<sub>Na<sup>+</sup></sub>) von 23,6 (n=3).



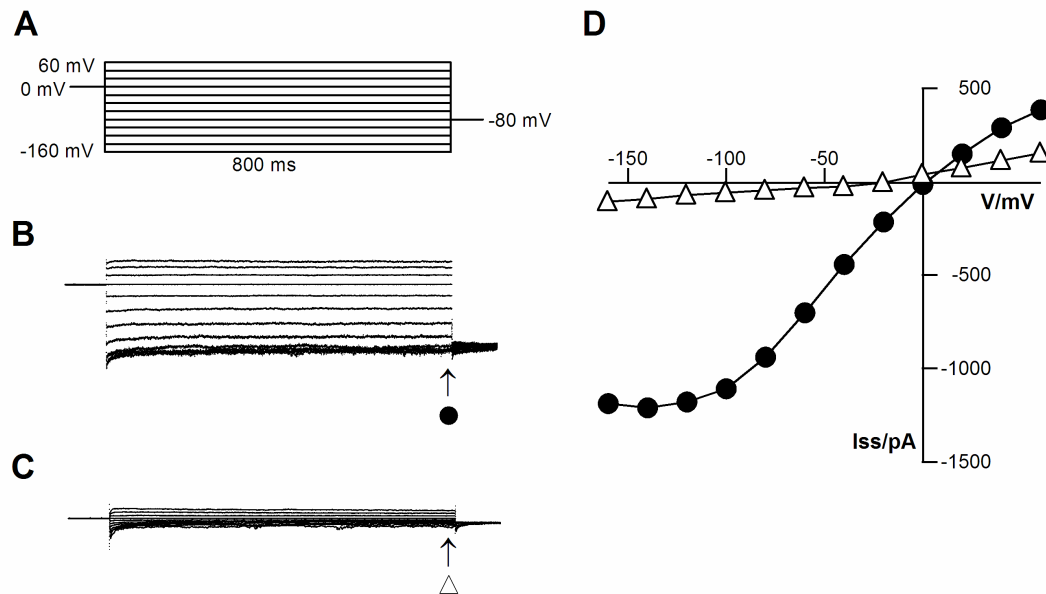
### Abb. 25: Selektivität für K<sup>+</sup> gegenüber Na<sup>+</sup> in der Kcv-P13A::EGFP-Mutante

Stromantworten einer Kcv-P13A transfizierten HEK293-Zelle auf ein Standard-Pulsprotokoll (A) in 100 mM K<sup>+</sup> (B) und in 100 mM Na<sup>+</sup> (C).

Die Strom-Spannungskurven zeigen die Veränderung der stationären Ströme und die Verschiebung des Umkehrpotentials beim Wechsel der extrazellulären Badlösung von 100 mM K<sup>+</sup> (●) auf 100 mM Na<sup>+</sup> (○).

### 3.6.2 Austausch von Prolin an Position 13 gegen geladene Aminosäuren

Wenn Prolin gegen die positiv geladene Aminosäure Arginin oder negativ geladene Aminosäure Aspartat ausgetauscht wurde führte dies zu einem Verlust der Kanalleitfähigkeit. Ein Beispiel einer Stromantwort einer mit Kcv-P13D transfizierten HEK293-Zelle ist in Abbildung 26C gezeigt. Die Leitfähigkeit unterscheidet sich nicht von den mit EGFP transfizierten Zellen. Das gleiche Ergebnis wurde auch in 15 Messungen mit der Kcv-P13R-Mutante erhalten. Die Transfektion von HEK293-Zellen mit den Kcv-Mutanten Kcv-P13D und Kcv-P13R führte zu keiner signifikanten Erhöhung des mittleren Stroms der stationären Ströme bei der Referenzspannung -140 mV gegenüber EGFP transfizierten Kontrollzellen (Abb. 26G). Dieses Ergebnis zeigt, dass eine zusätzliche negative oder positive Ladung auch an dieser Position nicht toleriert wird und zu einem Verlust der Kcv-typischen Leitfähigkeit führt.



**Abb. 26: Heterologe Expression der Kcv-P13D-Mutante in HEK293-Zellen**

Stromantworten einer Kcv (B) und Kcv-P13D (C) transfizierten HEK293-Zelle auf ein Standardpulsprotokoll (A). (D) Strom-Spannungs-Beziehungen der stationären Ströme  $I_{ss}$  aus B und C (Kcv (●) und Kcv-P13D (Δ)).

### 3.7 Position von Prolin im Kcv-Protein

Die Ergebnisse zeigen, dass Prolin an Position 13 im Kcv-Protein eine wichtige Rolle in der Funktion des Kanals spielt. Dies stimmt mit der Annahme überein, dass das Protein an dieser Stelle abknicken muss, damit die N-terminale Region parallel zur Membran-Cytoplasma-Grenzschicht positioniert ist. Um die Rolle dieses Knicks für die Funktion des Kanals zu verstehen, wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob die Position des Prolins im Kcv-Protein wichtig ist.

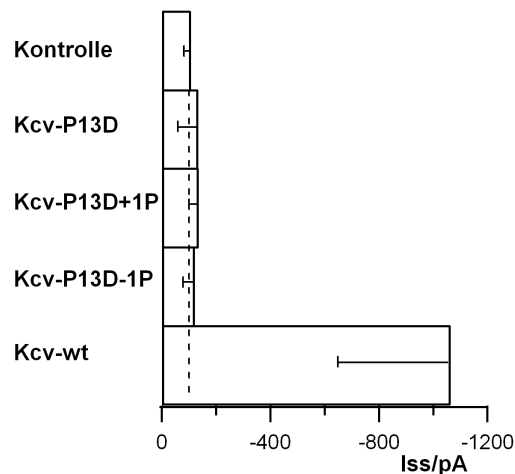
#### 3.7.1 Wiedereinfügen von Prolin in die Kcv-P13D-Mutante

In einem ersten Versuch wurde in die nicht funktionelle Mutante Kcv-P13D ein Prolin eingefügt, um zu sehen, ob die typische Kcv-Leitfähigkeit wiederhergestellt werden kann. Das Prolin wurde eine Aminosäure stromabwärts (Kcv-P13A+1P) und stromaufwärts (Kcv-P13A-1P) von der ursprünglichen Position eingefügt (Abb. 27).

Kcv-wt	MLVFSKFLTRTE-P-FMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS
Kcv-P13D	MLVFSKFLTRTE-D-FMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS
Kcv-P13D+1P	MLVFSKFLTRTE-DPFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS
Kcv-P13D-1P	MLVFSKFLTRTEPD-FMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS

**Abb. 27: Aminosäuresequenzen der Kcv-P13D-Mutanten.**

Die Mutanten wurden wiederum als EGFP-Fusionsproteine in HEK293-Zellen exprimiert. Ein Test dieser Mutanten in HEK-Zellen zeigte, dass keine von beiden Kanalmutanten eine Leitfähigkeit aufweist, die über die Kontrollen hinausgeht. Abbildung 28 zeigt die mittleren Stromantworten bei der Referenzspannung -140 mV im Vergleich zu Kontrollzellen und Kcv transfizierten HEK293-Zellen.



**Abb. 28: Heterologe Expression der Kcv-P13D-Mutanten in HEK293-Zellen**

Mittlere Stromantwort bei der Referenzspannung -140 mV mit ihren Standardabweichungen.

Diese Ergebnisse und auch die der vorhergehenden Experimente zeigen, dass ein Einfügen zusätzlicher Ladung in der N-terminalen Region nicht toleriert wird. Auch ein Wiedereinfügen von Prolin an eine andere Position in der Kcv-P13D-Mutante stellt die Leitfähigkeit nicht wieder her.

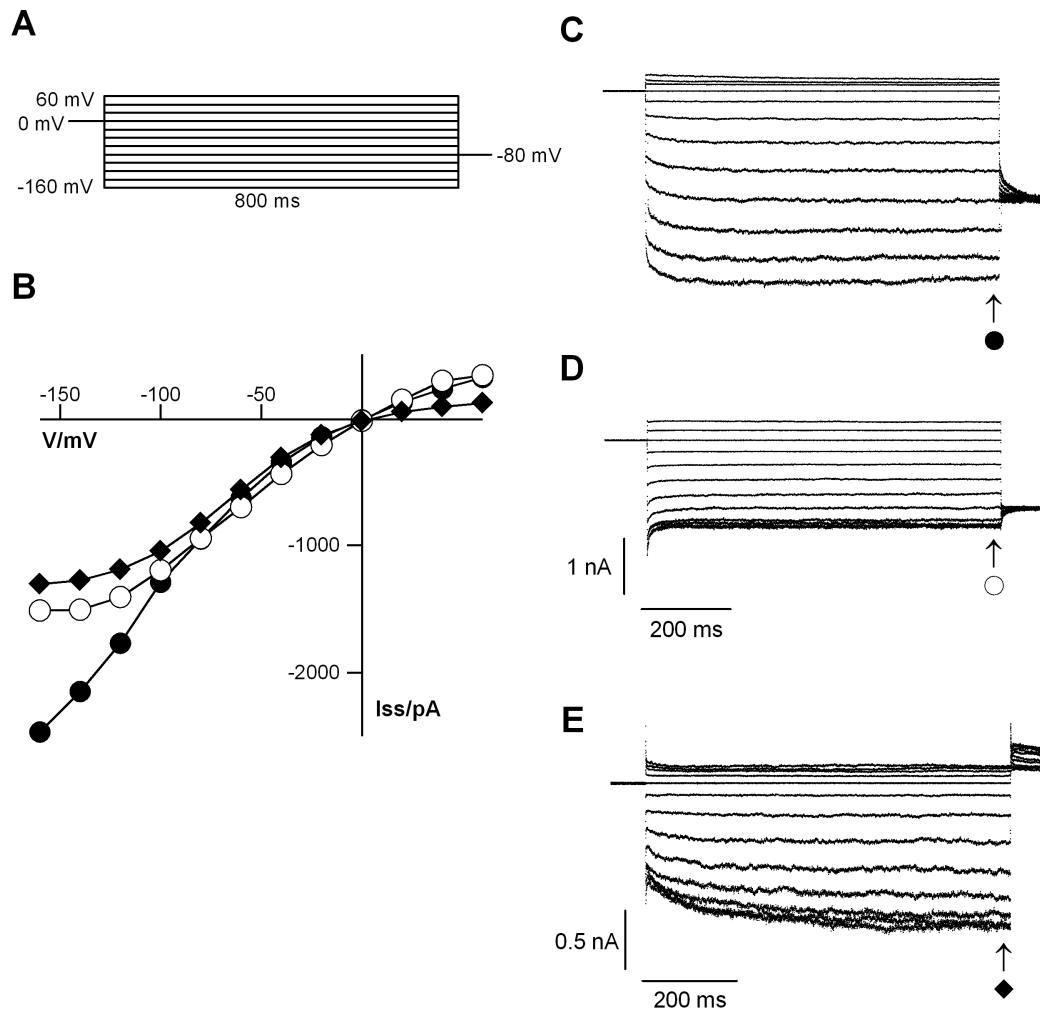
### 3.7.2 Wiedereinfügen von Prolin in die Kcv-P13A-Mutante

Die vorhergehenden Experimente zeigten, dass ein Austausch von Prolin gegen Alanin einen Effekt auf das Schaltverhalten des Kanals hat. Möglicherweise zerstört die Aminosäure Prolin die  $\alpha$ -helikale Konfiguration, während Alanin sie unterstützt. Um die Rolle der exakten Position des Prolins in der transmembranen Domäne zu untersuchen, wurde auch in der Mutante Kcv-P13A die Aminosäure Prolin eine Aminosäure stromabwärts (Kcv-P13A+1P) und stromaufwärts (Kcv-P13A-1P) von der ursprünglichen Position eingefügt (Abb. 29).

Kcv-wt	MLVFSKFLTRTE-P-FMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS
Kcv-P13A	MLVFSKFLTRTE-A-FMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS
Kcv-P13A+1P	MLVFSKFLTRTE-APFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS
Kcv-P13A-1P	MLVFSKFLTRTEPA-FMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS

**Abb. 29: Aminosäuresequenzen der Kcv-P13A-Mutanten.**

Die Mutanten wurden als EGFP-Fusionsproteine in HEK293-Zellen exprimiert. Ein funktioneller Test dieser Kanalmutanten zeigt, dass ein Einfügen von Prolin eine Aminosäure stromabwärts der ursprünglichen Position die typische Kcv-Leitfähigkeit wiederherstellt (Abb. 30D). Jedoch führt ein Einfügen an der Position -1 zu einem gemischten Phenotyp. Der Kanal behält die zeitabhängige Komponente, aber anders als in der P13A-Mutante ist die I/V-Beziehung (Abb. 30B) nicht länger linear. Wie im Kcv-wt Kanal sättigt der Strom bei extrem negativen Spannungen.



**Abb. 30: Heterologe Expression der Kcv-P13A-Mutanten in HEK293-Zellen**

Stromantworten einer Kcv-P13A (C), Kcv-P13A+1P (D) und Kcv-P13A-1P (E) transfizierten HEK293-Zelle auf ein Standardpulsprotokoll (A). (B) Strom-Spannungs-Beziehungen der stationären Ströme  $I_{ss}$  aus C, D und E (Kcv-P13A (●), Kcv-P13A+1P (○) und Kcv-P13A-1P (◆))

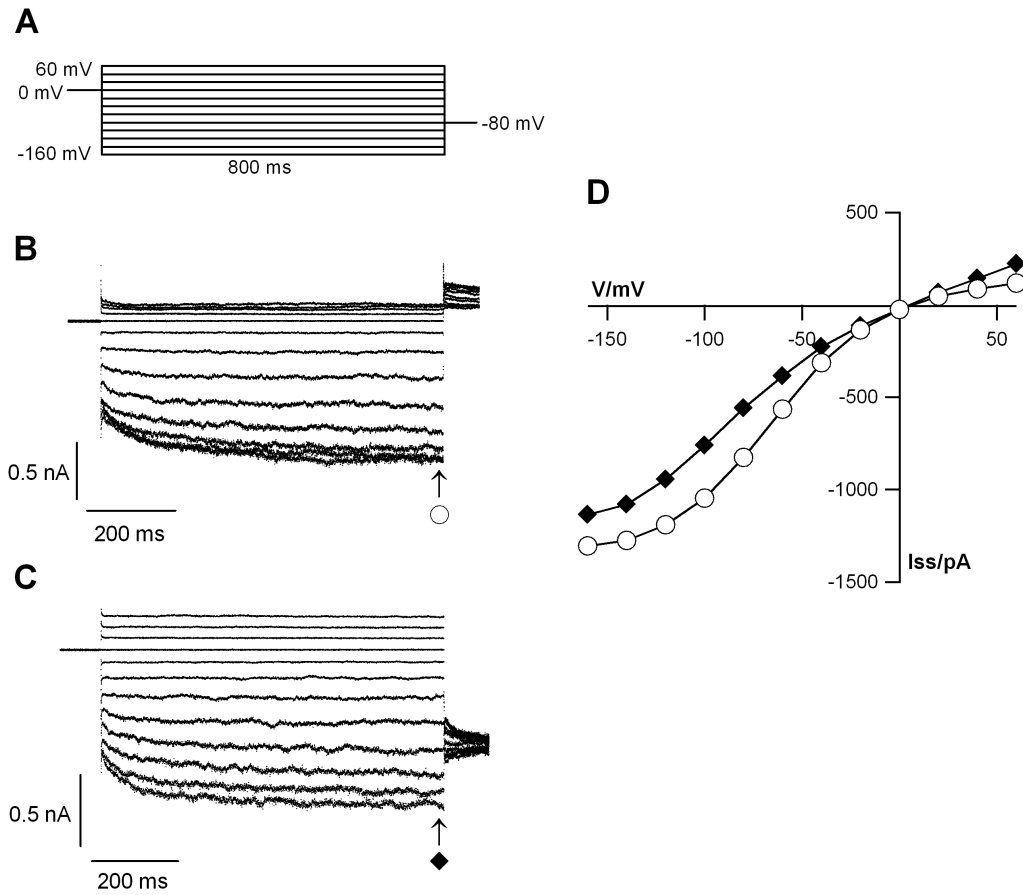
### 3.8 Verlängerung der ersten Transmembrandomäne im Kcv-Protein

Die Ergebnisse zeigen, dass eine zeitabhängige Komponente ebenfalls existiert, wenn Prolin in der N-terminalen Region von Kcv vorhanden ist. Die Mutation, in welcher das Prolin um eine Aminosäure stromaufwärts verschoben ist, führt zu einer Verlängerung der ersten Transmembrandomäne um eine Aminosäure, wohingegen ein Einfügen von Prolin eine Aminosäure stromabwärts keinen Einfluss auf die Transmembranlänge hat. Um zu untersuchen, ob das Schaltverhalten in Kcv-P13A-1P auch durch eine Verlängerung der ersten Transmembrandomäne erzeugt werden kann, wurde eine weitere Mutante konstruiert, in der ein zusätzliches Alanin an Position 16 im Kcv-Protein eingefügt wurde (Abb. 31).

```
Kcv-P13A+1P    MLVFSKFLTRTEPAFM-IHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS
Kcv-A16       MLVFSKFLTRTEP-FMAIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS
```

**Abb. 31: Aminosäuresequenzen der Kcv-A16-Mutante.**

Ein funktioneller Test dieser Mutante, als Fusionsprotein mit EGFP in HEK293-Zellen, zeigte, dass auch diese Modifikation zu einem Kanal führt, der eine zeitabhängige Komponente aufweist (Abb. 32C). Demnach führt eine Verlängerung der ersten Transmembrandomäne, egal ob diese nahe oder fern von dem Prolin an Position 13 gemacht wurde, zum Auftreten einer zeitabhängigen Komponente.



**Abb. 32: Heterologe Expression der Kcv-A16-Mutante in HEK293-Zellen**

Stromantworten einer Kcv-P13A-1P (**B**) und einer Kcv-A16 (**C**) transfizierten HEK293-Zelle auf ein Standardpulsprotokoll (**A**). (**D**) Strom-Spannungs-Beziehungen der stationären Ströme  $I_{ss}$  aus B und C (Kcv-A16 (○) und Kcv-P13A-1P (◆))

### 3.9 Kcv in unterschiedlichen Expressionssystemen

In früheren Arbeiten wurden bereits die Stromantworten von Kcv in unterschiedlichen Expressionssystemen verglichen und bestimmte Unterschiede festgestellt (Gazzarrini *et al.*, 2003): Im Vergleich zu Kcv in HEK293-Zellen zeigt Kcv in *Xenopus* Oocyten bei negativen Spannungen eine zeitabhängige Aktivierung, bei positiven Spannungen werden dagegen die Kanäle träge inaktiviert (Plugge *et al.*, 2000; Gazzarrini *et al.*, 2003). Der zeitabhängige Strom, welcher eine typische Komponente der Leitfähigkeit in Oocyten ist, wurde lediglich in einigen transfizierten HEK293-Zellen mit hoher Expression von Kcv gefunden. Detaillierte Analysen dieser Komponente zeigten, dass die Spannungsabhängigkeit in den beiden Expressionssystemen unterschiedlich ist. In HEK293-Zellen ist die Spannung für Halbmaximale-Aktivierung im Vergleich zu Oocyten um 60 mV zu mehr positivem Potential hin verschoben (Gazzarrini *et al.*, 2003). Es existieren somit Unterschiede in den kinetischen Eigenschaften zwischen den verschiedenen Expressionssystemen.

Es ist bekannt, dass Expressionssysteme die Eigenschaften auch von anderen Kanälen beeinflussen (z.B. Petersen *et al.*, 1999). Dieser Unterschied kann durch verschiedene zelluläre Umgebung, unterschiedlicher Kanalzusammenbau der Kanaluntereinheiten oder auch durch Unterschiede in der Lipidzusammensetzung oder Membrandicke in den unterschiedlichen Expressionssystemen zustande kommen.

Die Ergebnisse aus den vorhergehenden Experimenten unterstützen ein Modell, in welcher die Krümmung und das daraus folgende Verankern und Positionieren der Ersten Transmembrandomäne wichtig ist für das Schaltverhalten des Kanals. Jede Veränderung, die zu einer Verlängerung der TM1 führt, hat einen spannungs- und zeitabhängigen-Strom zur Folge. Dies gilt einmal für Mutanten in denen Prolin an Position 13 gegen Aminosäuren mit einer höheren Präferenz für die Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix (O'Neil und DeGrado, 1990) ausgetauscht wurde, aber auch für Mutanten in denen TM1 stromabwärts des Prolins um eine Aminosäure verlängert wurde. Dabei zeigte sich, dass es keine Rolle spielt, ob diese Verlängerung nahe oder fern vom Prolin durchgeführt wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Länge von TM1 wichtiger ist, als die exakte Position des Prolins. Da der Kaliumkanal Kcv im Vergleich zu anderen Kaliumkanälen relativ kurze Transmembrandomänen besitzt ist es durchaus möglich, dass die Dicke der Membran, in welche der Kanal inseriert wird, eine große Rolle auf die kinetischen Eigenschaften des Kanals hat.

Die Übereinstimmungen in der zeitabhängigen Komponente in den Kcv-Mutanten, exprimiert in HEK293-Zellen, und Kcv-wt in *Xenopus* Oocyten lassen den Schluss zu, dass in der Tat die Dicke der Membran, in welche der Kanal inseriert wird, eine Rolle spielen könnte. Die Plasmamembran der Oocyten hat womöglich eine dünnere Membrandicke als die menschlicher Zellen. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, habe ich die schon in HEK293-

Zellen gut charakterisierte Kcv-P13A-Mutante in einen Vektor für die Expression in *Xenopus* Oocyten umkloniert, um diese Mutante dann in Oocyten zu charakterisieren. Außerdem habe ich eine zweite Mutante hergestellt, bei der ich die TM1 um 2 Aminosäuren verkürzt habe (Kcv-2aa) (Abb. 33).

Kcv-wt	MLVFSKFLTRTEPFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS
Kcv-P13A	MLVFSKFLTRTEAFMIHLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS
Kcv-2aa	MLVFSKFLTRTEPF--HLFILAMFVMIYKFFPGGFENNF SVANPDKKAS

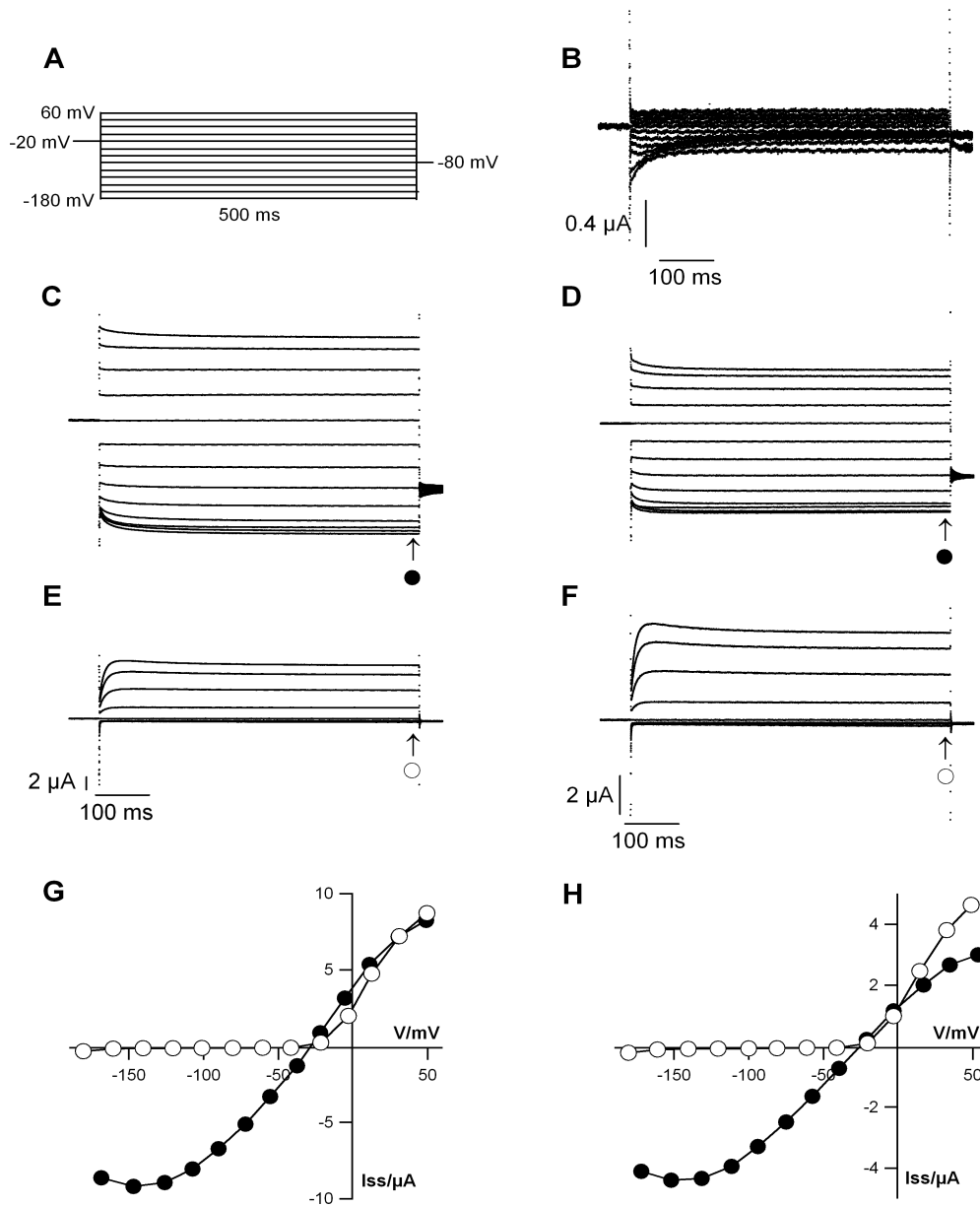
**Abb. 33: Aminosäuresequenzen der Kcv-Mutanten für die Expression in *Xenopus* Oocyten.**

### 3.9.1 Untersuchung der Mutanten in *Xenopus* Oocyten

*Xenopus* Oocyten sind neben Säugerzellen ein geeignetes System für die Expression fremder Kanalproteine, da sie eine geringe endogene Leitfähigkeit aufweisen und Fremdgene in der Regel gut exprimieren. 50 ng Kcv-cRNA, Kcv-P13A-cRNA bzw. Kcv-2aa-cRNA aus einer in-vitro-Transkription wurden in Oocyten injiziert und nach 2-3 Tagen die Leitfähigkeit mit der Methode der Zwei-Elektroden *voltage-clamp* gemessen. Zur Messung wurden Spannungsprotokolle benutzt, die Oozyten ausgehend von einer Haltespannung  $-20$  mV auf Referenzspannungen von  $60$  mV bis  $-180$  mV klemmen (Abb. 34A). Die anliegenden Spannungen und die resultierenden Ströme wurden gleichzeitig aufgezeichnet. Als Kontrolle dienten Oocyten, denen  $30$  nl  $H_2O$  ohne cRNA injiziert wurden.

#### Kcv-P13A-Mutante in *Xenopus* Oocyten

Die Ströme aller Kcv-Oocyten und Kcv-P13A-Oocyten waren in den Messungen deutlich von denen der Wasser-Kontrollen zu unterscheiden (Abb. 34). Die Stromantwort und die Strom-Spannungs-Beziehung in Abbildung 34 zeigen, dass die Leitfähigkeit und die Strom-Spannungsbeziehung der Kcv-P13A-Mutante sich nicht wesentlich vom Kcv-wt unterscheiden. Die Mutante Kcv-P13A zeigt auch die gleiche Sensitivität zu dem Kaliumkanalblocker  $Ba^{2+}$  wie Kcv-wt (Abb. 34).



**Abb. 34: Heterologe Expression des Kaliumkanal-Gens Kcv und der Kcv-P13A-Mutante in *Xenopus* Oocyten und Inhibition durch  $Ba^{2+}$ .**

Ganzzellmessung in 50 mM KCl von einer Wasser-injizierten Kontrollzelle (B), einer Zelle nach der Injektion von Kcv-cRNA (C) und Kcv-P13A-cRNA (D) auf ein Standard-Pulsprotokoll (A). Inhibition nach Zugabe von 1 mM  $Ba^{2+}$  von Kcv (E) und Kcv-P13A (F). (G) Strom-Spannungs-Beziehung der stationären Ströme ( $I_{ss}$ ) aus C und E ohne  $BaCl_2$  (●) und mit  $BaCl_2$  (○). (H) Strom-Spannungs-Beziehung der stationären Ströme ( $I_{ss}$ ) aus D und F ohne  $BaCl_2$  (●) und mit  $BaCl_2$  (○).

Ein Austausch von 50 mM K<sup>+</sup> gegen 50 mM Na<sup>+</sup> in der extrazellulären Lösung reduzierte bei Kcv-P13A injizierten Oocyten den Einwärtsstrom. Es kommt zu einem negativen Shift des Umkehrpotentials von  $82,3 \pm 9,3$  mV (n=3) was einem  $P_{K^+}/P_{Na^+}$ -Permeabilitäts-Verhältnis von 27,3 (n=3) entspricht. In mit Kcv-wt injizierten Oocyten kommt es zu einem negativen Shift von  $85,0 \pm 4,4$  mV (n=4) und einem  $P_{K^+}/P_{Na^+}$ -Permeabilitäts-Verhältnis von 29,5 (n=4). Die Kcv-P13A induzierte Leitfähigkeit zeigt somit in diesem Expressionssystem die gleiche Selektivität für K<sup>+</sup> gegenüber Na<sup>+</sup> wie Kcv-wt.

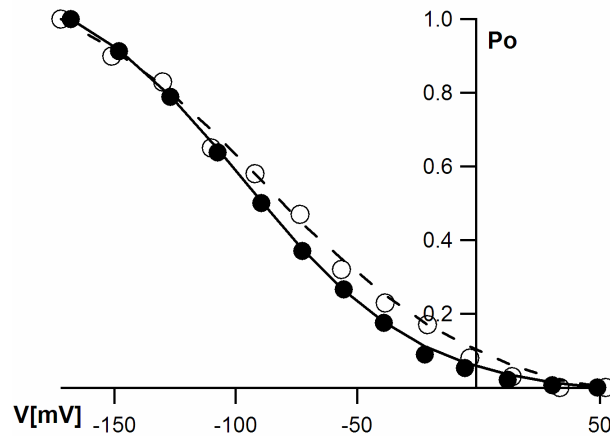
Um die Spannungsabhängigkeit der zeitabhängigen Komponente in der Kcv-P13A-Mutante genauer zu beschreiben, wurden an einem Beispiel die Tail-Ströme  $I_t$  genauer untersucht und mit dem Kcv Wildtyp verglichen. Die Amplitude der Tail-Ströme ( $I_t$ ), die direkt nach einem Spannungssprung auf -80 mV gemessen wurden, wurde gegen die Konditionierungsspannung (-160 bis 60 mV) aufgetragen. Die erhaltene Aktivierungskurve hat eine charakteristische Form, die die Spannungsabhängigkeit des Kanals widerspiegelt.

Die Kurven wurden mit einer Boltzmann-Funktion angepasst:

$$I_t = I_t(\text{max.}) / (1 + \exp((zF/RT) * V_{1/2} - V)) \quad (2)$$

$I_t(\text{max})$  – maximale Offenwahrscheinlichkeit;  $z$  – Spannungsabhängigkeitskoeffizient;  $V_{1/2}$  – Spannung für halbmaximale Aktivierung;  $V$  – Referenzspannung;  $F$  – Faraday-Konstante;  $T$  – absolute Temperatur;  $R$  – Gaskonstante

Die Boltzmann-Funktion beschreibt mit den Parametern  $z$  und  $V_{1/2}$  die Spannungsabhängigkeit eines Kanals (Hille 2001). In Abbildung 35 sind die gefitteten Kurven aus einer Kcv Wildtyp und einer Kcv-P13A Messung dargestellt. Für Kcv-P13A ergaben sich aus den Fitdaten die Parameter  $z=0,56$  und  $V_{1/2}=-88,6$  mV und für Kcv Wildtyp  $z=0,69$  und  $V_{1/2}=-96,5$  mV. Es zeigt sich somit keine große Änderung in der Spannungsabhängigkeit zwischen Kcv-wt und Mutante.



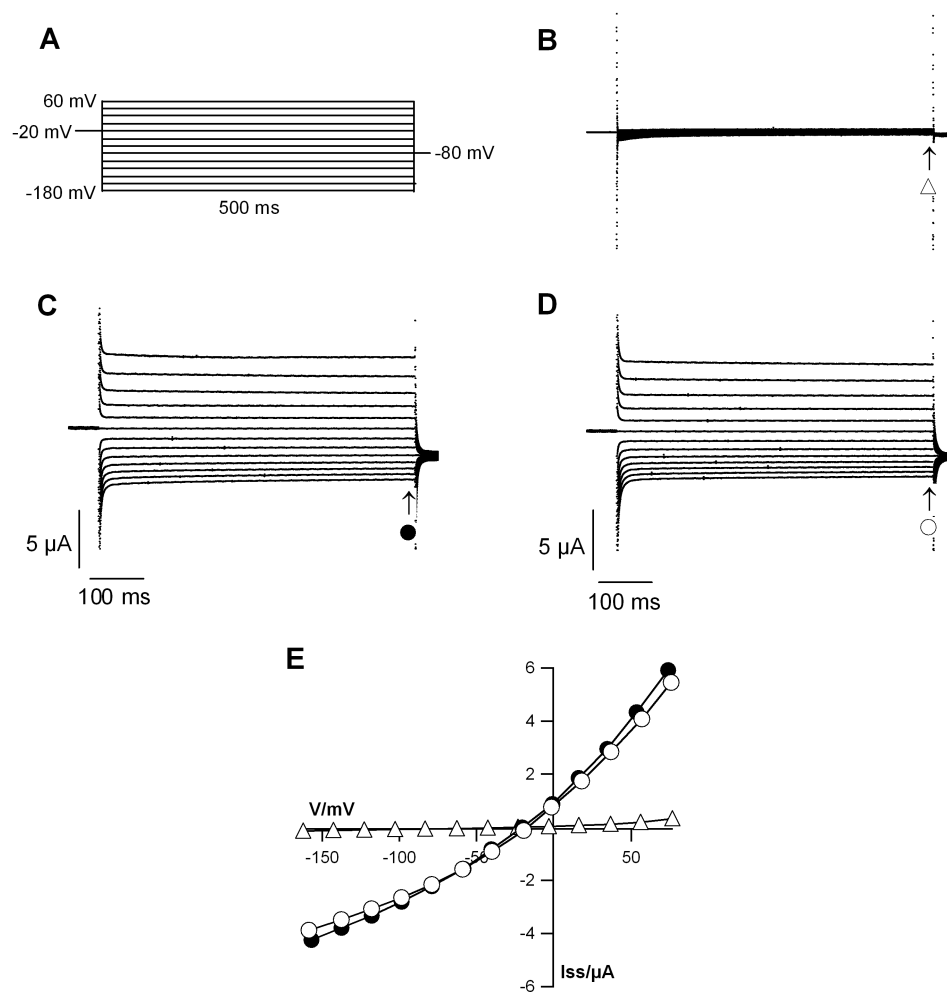
**Abb. 35: Aktivierungskurve von Kcv und Kcv-P13A**

Mit einer Boltzmann-Funktion gefittete Aktivierungskurve, die von den Tail-Strömen, aus einer Kcv Messung (●) und einer Kcv-P13A Messung (○), erhalten wurden (— Kcv und - - - Kcv-P13A).

Es sind somit keine erkennbaren Unterschiede zwischen der Kcv-P13A-Mutante und Kcv-wt in dem Expressionssystem *Xenopus* Oocyten festzustellen. Die Leitfähigkeit, die Strom-Spannungsbeziehung und die Spannungsabhängigkeit der Kcv-P13A-Mutante unterscheiden sich nicht merklich vom Kcv-wt. Die Mutante Kcv-P13A zeigt auch die gleiche Sensitivität zu dem Kaliumkanalblocker  $Ba^{2+}$  und die gleiche Selektivität für  $K^+$  gegenüber  $Na^+$  wie der Wildtyp Kcv. Diese Ergebnisse lassen erneut den Schluss zu, dass die Dicke der Membran, in welche der Kanal inseriert wird, eine Rolle spielen könnte. Die Plasmamembran der Oocyten hat womöglich eine dünnere Membrandicke als die menschlicher Zellen und deshalb hat eine Verlängerung der  $\alpha$ -Helix der TM1 im Oocytensystem keine Auswirkung auf das Kanal-Gating; zumal Kcv, exprimiert in Oocyten, bereits eine zeitabhängige Komponente besitzt. Deshalb war es nun von großem Interesse eine Kcv-Mutante in Oocyten zu untersuchen, die eine verkürzte TM1 besitzt.

### Kcv-2aa in *Xenopus* Oocyten

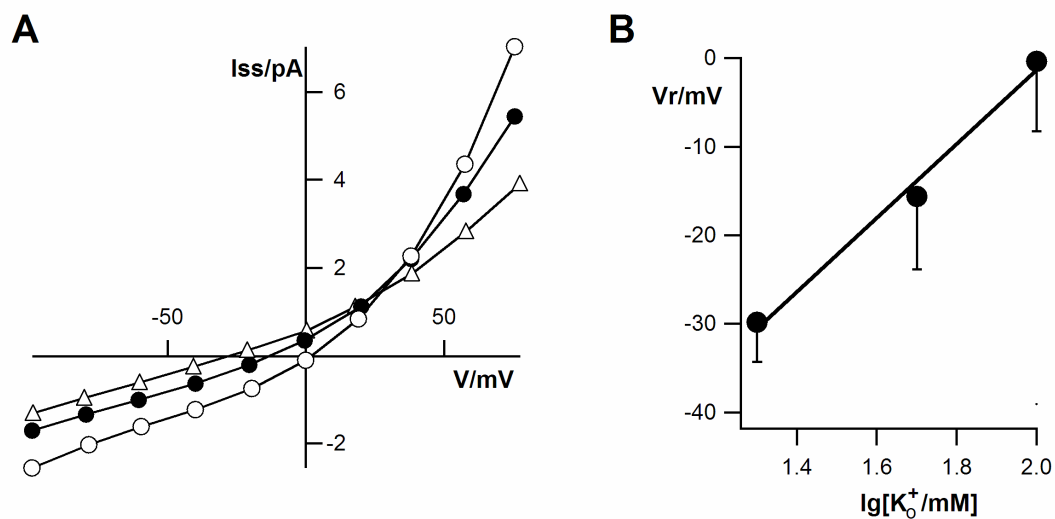
Die Ströme aller Kcv-2aa-Oocyten waren in den Messungen deutlich von denen der Wasser-Kontrollen zu unterscheiden (Abb. 36). Die Stromantwort und die Strom-Spannungs-Beziehung in Abbildung 36 zeigen jedoch, dass die Leitfähigkeiten der Kcv-2aa-Mutante sich wesentlich vom Kcv-wt im gleichen Testsystem unterscheiden. Es kommt zu einem Verlust der zeitabhängigen Komponente und der Inaktivierung bei extrem negativen und positiven Spannungen. Die Mutante Kcv-2aa zeigt ferner auch nur eine geringe Sensitivität zu dem Kaliumkanalblocker Ba<sup>2+</sup> (Abb. 36D).



**Abb. 36: Heterologe Expression der Kcv-2aa-Mutante in *Xenopus* Oocyten**

Ganzzellmessung in 50 mM KCl von einer Wasser-injizierten Kontrollzelle (C) und einer Zelle nach der Injektion von Kcv2aa-cRNA (B) auf ein Standard-Pulsprotokoll (A). Effekt von 1 mM Ba<sup>2+</sup> auf die Kcv-2aa induzierte Leitfähigkeit (D). (E) Strom-Spannungs-Beziehung der stationären Ströme (I<sub>ss</sub>) aus B, C und D (ohne BaCl<sub>2</sub> (●) und mit BaCl<sub>2</sub> (○)).

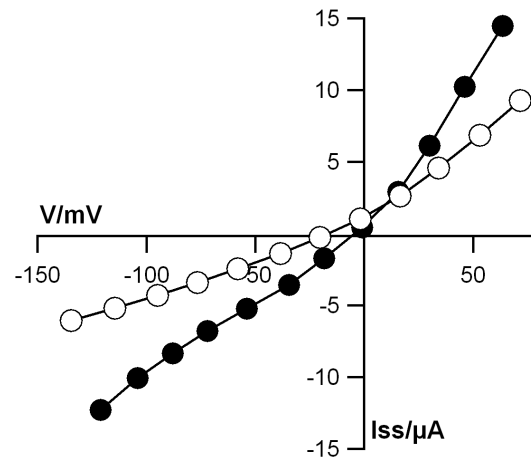
Zur Bestimmung der  $K^+$ -Selektivität wurden die Umkehrspannungen bei 20, 50 und 100 mM KCl im Badmedium bestimmt. Wie es für einen  $K^+$ -selektiven Kanal nach der Nernst-Gleichung zu erwarten ist, verschob sich die Umkehrspannung bei zunehmenden  $K^+$ -Konzentrationen zu positiveren Werten (Abb. 36A). Abbildung 36B zeigt die lineare Beziehung in einem halblogarithmischen Plot zwischen der Umkehrspannungen und der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration. Die errechnete Steigung von 41,7 mV/Dekade bei Kcv-2aa injizierten Oocyten zeigte eine geringere  $K^+$ -Selektivität als Kcv-wildtyp, wo ein Anstieg um 60,0 mV bei der Verzehnfachung der  $K^+$ -Konzentration beobachtet wurde. Letzterer Wert stimmt gut mit dem Wert für einen idealen  $K^+$ -selektiven Kanal (58 mV/Dekade) aus der Nernst-Gleichung überein (Plugge *et al.*, 2000).



**Abb. 36: Selektivität für  $K^+$  in der Kcv-2aa-Mutante**

(A) Stationärer Strom der Kcv-2aa-Mutante bei verschiedenen  $K^+$ -Konzentrationen (100 mM, 50 mM und 20 mM  $K^+$ ) als Funktion der Spannung. (B) Nernst-plot: Die ermittelten Umkehrspannungen aus 9 Messungen ( $V_r$ ) sind gegen den Logarithmus der  $K^+$ -Konzentration aufgetragen. Die Geradensteigung für Kcv-2aa beträgt 41,7 mV/Dekade.

Ein Austausch von  $K^+$  gegen  $Na^+$  in der extrazellulären Lösung reduzierte den Einwärts- und Auswärtsstrom bei Kcv-2aa-Oocyten (Abb. 37). Es kommt zu einem geringen aber systematischen negativen Shift des Umkehrpotentials von  $12,8 \pm 1,9$  mV ( $n=3$ ). Dieses Experiment zeigte, dass die Kcv-2aa-Mutante eine, wenn auch geringe Selektivität für  $K^+$  gegenüber  $Na^+$  aufweist. Verglichen mit dem wt-Kanal, wo es zu einem negativen Shift von  $85,0 \pm 4,4$  mV ( $n=4$ ) kommt ist die Selektivität der Kcv-2aa-Mutante geringer.



**Abb. 37: Selektivität für K<sup>+</sup> gegenüber Na<sup>+</sup> in der Kcv-2aa-Mutante**

Die Strom-Spannungskurven zeigen die Veränderung der stationären Ströme und die Verschiebung des Umkehrpotentials beim Wechsel der extrazellulären Badlösung von 50 mM K<sup>+</sup> (●) auf 50 mM Na<sup>+</sup> (○).

Eine Verkürzung der ersten Transmembrandomäne führt zu einer Verringerung der K<sup>+</sup>-Selektivität und der Selektivität für K<sup>+</sup> gegenüber Na<sup>+</sup>. Ferner zeigt die Mutante Kcv-2aa nur eine geringe Sensitivität zu dem Kaliumkanalblocker Ba<sup>2+</sup>. Die Verkürzung hat somit einen großen Effekt auf die Kanaleigenschaften von Kcv.

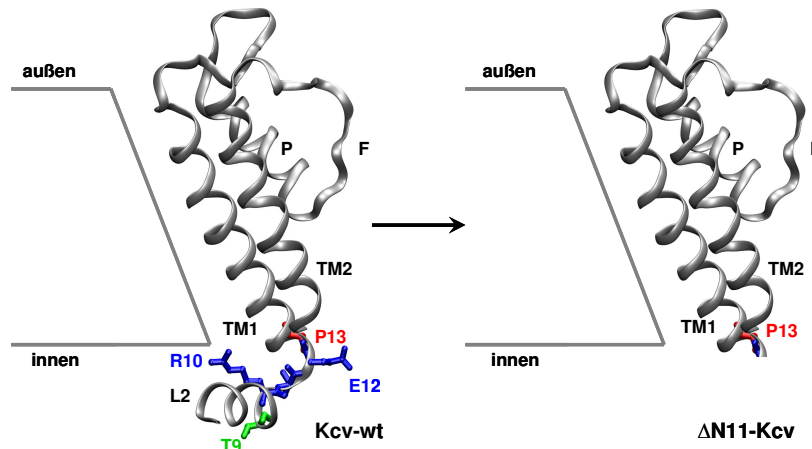
## 4. Diskussion

Homologiemodellierung von Kcv zeigt, dass der virale K<sup>+</sup>-Kanal eine Struktur besitzt, die große Ähnlichkeit zu KirBac1.1 hat, einem bakteriellen Kaliumkanal, von dem eine Kristallstruktur mit einer Auflösung von 3,65 Å existiert. (Kuo *et al.*, 2003; Gazzarrini *et al.*, 2004). Diese Ähnlichkeit schließt auch das Vorhandensein einer helikalen Domäne stromaufwärts von der ersten Transmembrandomäne ein, die sich an der Membran-Cytoplasma-Grenzschicht befindet. Diese molekulare Architektur scheint bei 2TM K<sup>+</sup>-Kanälen verbreitet zu sein. Auch die Struktur von KcsA, ein weiterer kristallisierter bakterieller Kaliumkanal, sagt solch eine N-terminale helikale Struktur an der Membran-Wasser-Grenzschicht voraus (Cortes *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde besonders der Frage nach der funktionellen Rolle dieses kurzen cytoplasmatischen N-Terminus von Kcv in Kombination mit seinem Interaktionspartner, der ersten Transmembrandomäne (TM1), nachgegangen.

### Der N-Terminus ist essentiell für die Funktion des Kanals

In vorangegangenen Untersuchungen an Kcv wurde eine funktionelle Rolle der kurzen cytoplasmatischen N-terminalen Domäne gezeigt. Nach Entfernen der 14 N-terminalen Aminosäuren (M1-F14) im Kcv-Protein kam es zu einem Verlust der Leitfähigkeit in verschiedenen heterologen Expressionssystemen (Moroni *et al.*, 2002). Dies wurde mit einem Verlust an Funktion interpretiert, da die Verkürzung des Proteins keinen erkennbaren Einfluss auf die Kanalsynthese und intrazelluläre Verteilung zeigte (Moroni *et al.*, 2002). Auch bei dem Kaliumkanal KcsA ergab sich ein Verlust der Kanalleitfähigkeit bei Entfernen von 20 Aminosäuren stromaufwärts von TM1, eine Region, die strukturell dem Teil entspricht, der bei Kcv entfernt wurde (Cortes *et al.*, 2001; Moroni *et al.*, 2002). Für KcsA wird postuliert, dass es durch die Verkürzung des Proteins zu einer Reduktion der Expression des Proteins kommt. Möglicherweise enthält der N-Terminus von KcsA Informationen, die für ein korrektes Falten und Targeting des Kanals zur Plasmamembran wichtig sind. Außerdem wird für KcsA postuliert, dass der N-Terminus den Kanal in der Membran verankert, da positive Reste in dieser Region ionische Interaktionen mit negativ geladenen Lipiden an der inneren Seite der Membran eingehen können (Cortes *et al.*, 2001).

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse liefern einen weiteren Einblick in die Funktion der N-terminalen Region des Kcv-Proteins und möglicherweise für K<sup>+</sup>-Kanäle allgemein. Es konnte gezeigt werden, dass ein komplettes Entfernen des cytoplasmatischen N-Terminus von Kcv (L2-E12) zu einem Verlust der Leitfähigkeit in HEK293-Zellen führt. Die entsprechende  $\Delta$ N11-Kcv-Mutante zeigte keine erkennbare Ionenleitfähigkeit mehr. Homologie-Modellierung von Kcv an der KirBac1.1 Struktur zeigt, dass dieser Teil (L2-E12) genau dem cytoplasmatischen N-terminalen Bereich entspricht (Abb. 38).



**Abb. 38: Strukturmodell von Kcv und der  $\Delta$ N11-Kcv-Mutante.** Eine von vier Proteinuntereinheiten ist in der Seitenansicht gezeigt (transmembrane Helices TM1 und TM2, Porenhelix P und Filterregion F; nach dem Homologiemodell von Sascha Tayefeh verändert).

Durch Western-Blot-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die  $\Delta$ N11-Kcv-Mutante in HEK293-Zellen exprimiert wird. Neben der monomeren Form bei etwa 37 kDa von  $\Delta$ N11-Kcv::EGFP wurde auch eine Bande bei etwa 85 kDa markiert. Hierbei könnte es sich um eine multimeren Form von Kcv handeln. Betrachtet man die apparenten Molmassen, so könnte es sich rein rechnerisch um ein Kcv-Dimer handeln. Es ist bekannt, dass Kaliumkanäle sehr stabile Oligomere bilden können, die selbst durch Detergenz- oder Temperatur-Behandlung stabil bleiben (Cortes und Perozo, 1997). Diese hohe Stabilität kommt nicht nur alleine durch Interaktionen zwischen den Proteinuntereinheiten zustande, sondern auch durch Interaktionen zwischen dem Protein und dem umgebenden Lipidbilayer. So wurde gezeigt, dass die Effizienz der Tetramerbildung von KcsA von der Lipidzusammensetzung der Membran abhängt (vanDalen *et al.*, 2002). Für Kcv wurde bereits gezeigt (Pagliuca, 2005), dass der Kanal unter bestimmten Bedingungen stabile Tetramere bildet. Dabei zeigte sich eine Kationen spezifische Stabilisierung der Oligomeren-Form des Kcv-Proteins. Selbst bei Hitzebehandlung (3 min 95 °C) war in Anwesenheit von  $K^+$  das Tetramer im SDS-Gel stabil. Somit könnte es sich bei der im Western Blot markierten 85 kDa-Bande der  $\Delta$ N11-Kcv-Mutante um eine oligomere Form des Proteins handeln. Demnach spielt der N-Terminus keine essentielle Rolle bei der Oligomerisierung des Kcv-Proteins. Für die Zusammensetzung der Kcv-Monomere müssen somit starke Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Transmembranregionen angenommen werden. Solche Interaktionen sind z.B. für Kir2.1-Tetramere beschrieben worden (Minor *et al.*, 1999). Da Kcv, anders als Kir2.1, nur aus den Transmembransegmenten besteht, zeigen die vorliegenden Daten, dass die Interaktion dieser Elemente ausreichend für die stabile Oligomerisierung ist.

Außerdem zeigte die Western-Blot-Analyse, dass die beiden Proteine Kcv und  $\Delta N11$ -Kcv gleich stark in HEK293-Zellen exprimiert werden. Demnach ist die Proteinsynthese nicht dafür verantwortlich, dass die  $\Delta N11$ -Kcv-Mutante nicht mehr funktionell ist.

Die Untersuchung der Fluoreszenzverteilung in transfizierten HEK293-Zellen mit der Confokalen Laser Scanning Mikroskopie zeigte, dass sowohl Kcv als auch die  $\Delta N11$ -Kcv-Mutante keine Unterschiede in der intrazellulären Verteilung haben. Bei beiden Konstrukten akkumulierte die Fluoreszenz in netzwerkartigen, tubulären Strukturen; um den Kern war ein geschlossener fluoreszierender perinukleärer Ring zu erkennen. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass auch die Mutante so wie Kcv-wt in Membranen integriert wird. Jedoch konnte mit diesen Methoden keine eindeutige Lokalisation, weder vom wt-Kanal noch von der Mutante, in der Plasmamembran gezeigt werden. Als mögliche Ursache für die Fehlfunktion der Mutante kommt somit immer noch eine fehlerhafte Oberflächenexpression des Proteins in Frage.

Bei dem Kaliumkanal Kir2.1 wurde ein Verlust der Oberflächenexpression bei Mutanten gefunden, denen die N-terminale Domäne (Kir2.1 $\Delta 1-76$ ) entfernt wurde (Stockklausner und Klöcker, 2003). Weitere Untersuchungen an Kir2.1 zeigten, dass eine Deletion von bis zu 43 Aminosäuren vom N-terminalen Ende keine Auswirkung auf die Lokalisation von Kir2.1 in der Plasmamembran hatte. Eine weitere Verkürzung führte zu einem Verlust an Membranexpression und einem Anstieg an Akkumulation des Proteins im Golgi. Somit scheint nicht die Länge, sondern eine spezifische Sequenzinformation für das Targeting zur Plasmamembran notwendig zu sein. Die Autoren konnten zeigen, dass positiv geladene Aminosäuren im N-Terminus von Kir2.1 kritisch für die Oberflächenexpression sind. Positiv geladene Reste sind im N-Terminus von allen Kir-Kanälen konserviert. Neutralisierung der konservierten positiven Aminosäuren führte zu einer Akkumulation des Kanals im Golgi-Kompartiment (Stockklausner und Klöcker, 2003).

Auch Experimente an dem Kaliumkanal KcsA aus *Streptomyces lividans* zeigten, dass eine Deletion der ersten 20 Aminosäuren zu einer drastischen Reduktion an Expression führte (Pezzo *et al.*, 1999; Cortes *et al.*, 2001). Daher scheint auch bei KcsA der N-Terminus Signalsequenzen zu besitzen, die wichtig sind für das korrekte Falten oder Targeting des Kanals (Cortes *et al.*, 2001). Auch Kcv besitzt positiv geladene Aminosäuren im N-Terminus (K6, R10). Jedoch konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass ein Austausch dieser positiv geladenen Aminosäuren gegen die neutrale Aminosäure Alanin (Kcv-K6A-R10A) keinen Effekt auf die Kanalfunktion und somit auf die Oberflächenexpression des Proteins hatte (Gazzarrini *et al.*, 2003). Somit scheinen die positiv geladenen Aminosäuren in der N-terminalen Domäne von Kcv (K6, R10), anders als bei KcsA und Kir2.1, nicht essentiell für die Funktionalität bzw. für das korrekte Falten oder Targeting des Kanals zu sein.

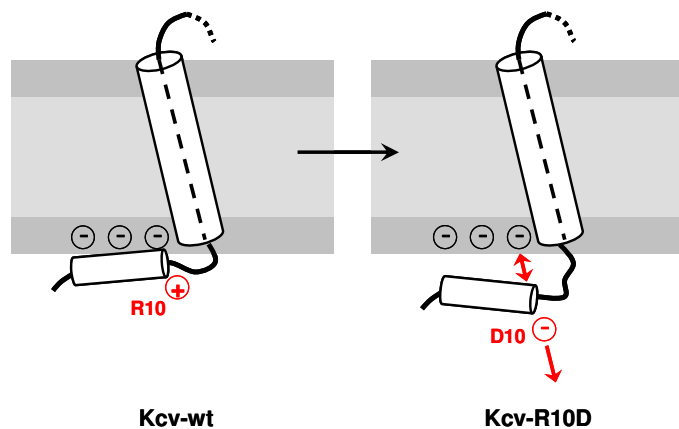
Normalerweise werden Membranproteine mittels einer Signalsequenz zu bestimmten zellulären Kompartimenten transportiert (Hopkins, 1992). So sind mittlerweile eine Reihe verschie-

dener ER Export Motive bekannt, die alle innerhalb der cytoplasmatischen Domänen der Membranproteine liegen. Dabei handelt es sich meist um eine diacide Sequenz (-DXD-, -DXE- oder -EXD-) (Nishimura und Balch, 1997; Ma *et al.*, 2001). Der tierische K<sup>+</sup>-Kanal Kir2.1 enthält ein diacides ER Export Signal -FCYENE-, dass bei Mutation zu einer stark verminderten Menge des Kanals in der Plasmamembran führt (Ma *et al.*, 2001). Es kommt zur Anreicherung des Proteins im ER. Weiterhin besitzt der Kanal Kir2.1 ein Golgi Export Signal am N-Terminus. Stockklausner und Klöcker (2003) konnten zeigen, dass bei Mutation des Motivs eine Akkumulation des Proteins im Trans-Golgi-Netzwerk stattfindet. Solche Signalsequenzen fehlen im cytoplasmatischen N-Terminus von Kcv. Somit ist anzunehmen, dass die Ursache des Verlustes an Kcv-Aktivität in der  $\Delta N11$ -Kcv-Mutante nicht durch einen Verlust an Oberflächenexpression zustande kommt. Jedoch kann dies nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher gilt es in der Zukunft die  $\Delta N11$ -Kcv-Mutante in der Plasmamembran nachzuweisen.

### **Kritische Länge des N-Terminus**

Die Studien an Kcv-Mutanten mit verkürzter N-terminaler Domäne zeigten die Bedeutung einer kritischen Länge des N-Terminus. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass die ersten 7 Aminosäuren von Kcv nicht essentiell für die Kanalfunktion sind. Jedes weitere Verkürzen führte jedoch zu einer drastischen Reduktion bis hin zu einem Verlust der Kcv-typischen Leitfähigkeit. In weiteren Experimenten zeigte sich, dass die Länge an erforderlichen Aminosäuren wichtiger ist, als die Aminosäurezusammensetzung. Die erste der erforderlichen Aminosäuren, Threonin an Position 9, kann gegen Alanin und Serin ausgetauscht werden ohne einen erkennbaren Effekt an Kanalfunktion. Dieses Ergebnis zeigt, dass diese Position 9, was die Art der Aminosäure angeht, sehr flexibel ist. Jedoch wurde ein Austausch gegen eine negativ geladene Aminosäure an dieser Position nicht toleriert. Auch ein Austausch der positiv geladenen Aminosäure Arginin an Position 10 gegen die negativ geladene Aminosäure Aspartat sowohl in der  $\Delta N7$ -Kcv-Mutante als auch im Kcv-wt führte zu einem kompletten Verlust der Kcv-typischen Leitfähigkeit. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine zusätzliche negative Ladung sowohl in der  $\Delta N7$ -Kcv-Mutante, als auch im Kcv-wt nicht toleriert wird und zu einem Verlust der Kanalleitfähigkeit führt. Es scheint somit, dass der Ladungszustand der N-terminalen Domäne von Kcv wichtig für die Funktionalität des Kanals ist, da eine Zunahme an negativer Ladung in der N-terminalen Region von Kcv nicht toleriert wird. Man weiß, dass die Membran-Wasser Grenzschicht eine wichtige Rolle in der Struktur und Funktion von Transmembranproteinen spielt (Domene *et al.*, 2003; Killian und von Heijne, 2000). Diese Interaktionen sind von den spezifischen Eigenschaften der Aminosäure-Seitenketten des Proteins abhängig. So kommt es z.B. zu elektrostatischen Interaktionen zwischen positiv geladenen Aminosäuren des Proteins und den negativ geladenen Kopfgruppen der Lipide. Für die N-terminale amphipatische *slide*-Helix von KirBac1.1 wird postuliert, dass sie mit den Lipid-Kopfgruppen interagiert (Domene *et al.*, 2004). Auch für KcsA wurde gezeigt, dass

Lipid-Protein-Interaktionen wichtig sind für die Kanalfunktion (Valiyaveetil *et al.*, 2002; Demmers *et al.*, 2003; Brink-van der Laan *et al.*, 2004). Somit könnten zusätzliche negative Ladungen in der N-terminalen Region von Kcv dazu führen, dass es zu einer Abstoßung dieser Region durch die negativ geladenen Lipidkopfgruppen kommt und somit eine Positionierung parallel zur Membran und eine mögliche Verankerung des Kanals in der Membran nicht mehr gewährleistet wird (Abb. 39). Jedoch scheinen für solch eine Positionierung keine positiv geladenen Aminosäuren essentiell zu sein. Ob zusätzliche positive Ladungen im N-Terminus von Kcv eine Auswirkung auf die Kanalleitfähigkeit haben, wurde bisher nicht untersucht.



**Abb. 39: Mögliche Positionierung der N-terminalen Domäne und der TM1 von Kcv-wt und der Kcv-R10D-Mutante.** Zusätzliche negative Ladungen in der N-terminalen Region von Kcv könnten zu einer Abstoßung dieser Region durch die negativ geladenen Lipidkopfgruppen führen.

### Bedeutung eines Winkels zwischen dem N-Terminus und der TM1

Die Ergebnisse zeigen neben einer kritischen Länge der N-terminalen Domäne auch die Bedeutung eines Winkels, welcher diese Domäne mit der TM1 verbindet.

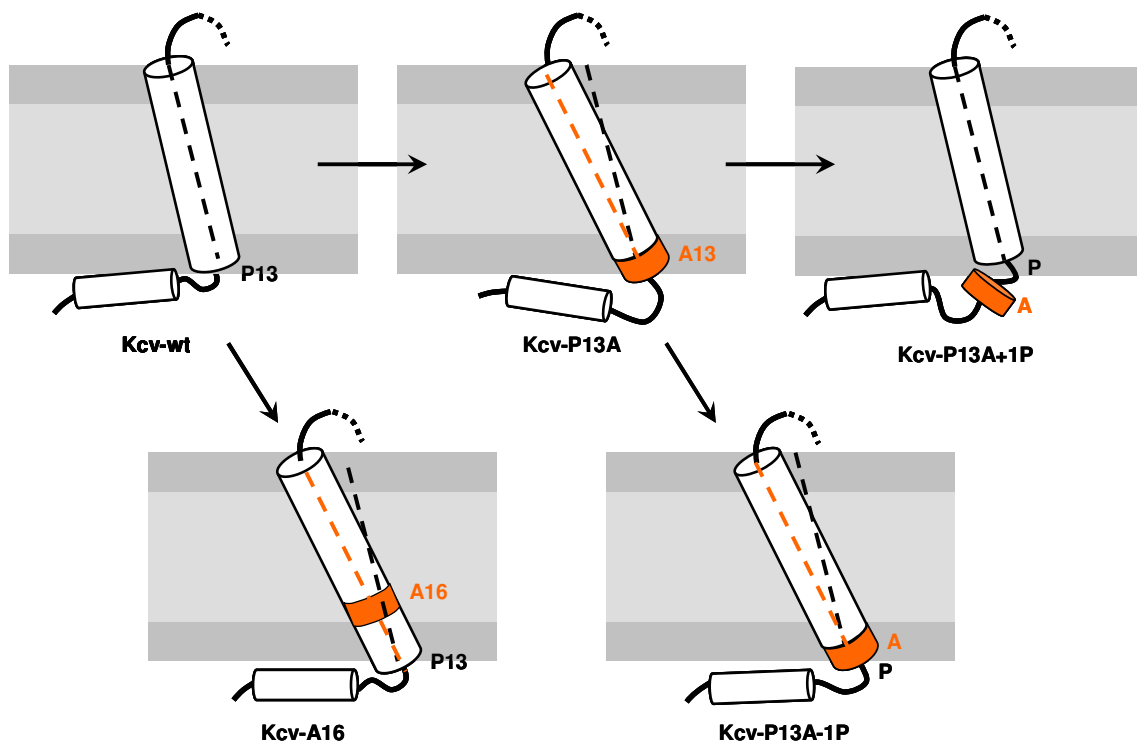
Sowohl von der KirBac1.1, als auch von der KcsA Struktur zeigt sich, dass die N-terminale Domäne dieser Proteine über einen Knick mit der TM1 verbunden ist (Kuo *et al.*, 2003; Cortes *et al.*, 2001). Dieser Knick erlaubt eine winkelförmige Orientierung zwischen der Transmembrandomäne TM1 und der N-terminalen Helix. In diesem Fall kann die N-terminale Region parallel zur Membran verlaufen. In KirBac1.1 wird dieser Winkel durch ein Prolin an Position 61 produziert (Kuo *et al.*, 2002). Es ist bekannt, dass die strukturelle Auswirkung von Prolin in der Hauptlinie einer  $\alpha$ -Helix solch eine Krümmung verursacht (Cordes *et al.*, 2002). Prolinreste sind allgemein in Transmembranhelices von Transportproteinen weit verbreitet und scheinen im besonderen Fall von Ionenkanälen eine funktionelle Rolle im *Gating*-Mechanismus zu spielen (Tieleman *et al.*, 2001; Labro *et al.*, 2003). Bei der Untersuchung der Verteilung von Prolinresten in Transmembranhelices wurde eine Bevorzugung der terminalen

und zentralen Region gefunden (Ulmschneider und Sansom, 2001; Cordes *et al.*, 2002). In KcsA wird eine ähnliche Krümmung womöglich durch die Aminosäure Glycin an Position 21 gebildet (Cortes *et al.*, 2001). Die genaue Untersuchung der Kcv Aminosäuresequenz zeigt, dass der virale Kaliumkanal genau am Beginn der TM1 an Position 13 ein Prolin besitzt (Abb. 38). Dies deutet auf eine ähnliche Krümmung der Struktur wie in KirBac1.1 zwischen TM1 und der N-terminalen helikalen Domäne hin. Der entsprechende Knick in der Proteinstruktur wird auch von der NMR-Struktur und dem Homologiemodell vorhergesagt. Diese strukturelle Analogie zwischen Kcv und den bakteriellen Kaliumkanälen zusammen mit der bedeutenden Rolle von Prolinresten als Knickpunkt in helikalen Domänen können die hier präsentierten Daten erklären.

In diesem Zusammenhang unterstützen die Daten ein Modell in welcher die Krümmung und die daraus folgende Verankerung und Positionierung von TM1 wichtig sind für den *Gating*-Mechanismus des Kanals. Jede Verlängerung von TM1 führt zu einer Zeit- und Spannungs-abhängigen Komponente. Dies ist für Mutanten der Fall in welcher das Prolin an Position 13 gegen Alanin, Leucin, Phenylalanin und Glycin ausgetauscht wurde.

Die Expression von Kcv-P13A in HEK293-Zellen führte zu einer Kaliumkanalaktivität, die sich in einigen charakteristischen Merkmalen von Kcv unterscheidet: i) Veränderte Kinetik mit einem biphasischen Stromverlauf, ii) keine Inaktivierung bei Testspannungen unter -80 mV, wie sie für Kcv-wt typisch ist, iii) eine signifikant höhere Stromamplitude und iv) eine etwas erhöhte Selektivität für  $K^+$  gegenüber  $Na^+$  im Vergleich zum Kcv-wt.

Einen biphasischen Stromverlauf wie bei den P13A-Mutanten zeigen auch Mutanten, in welchen die  $\alpha$ -Helix stromabwärts von Prolin an Position 13 durch ein Alanin erweitert wurde. In diesem Fall spielt es keine Rolle, ob diese Erweiterung direkt (Kcv-P13A-1P) oder weiter entfernt (Kcv-A16) vom Prolin an Position 13 im Kcv Protein eingeführt wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Länge von TM1 wichtiger ist, als die exakte Position von Prolin. Des Weiteren hat eine Verlängerung der N-terminalen Region stromaufwärts von der Aminosäure Prolin (Kcv-P13A+1P) keinen Einfluss auf die Kanalfunktion. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Ansicht, dass die Krümmung der Helix durch die Position des Prolins bestimmt wird und dass jede Modifizierung stromaufwärts von Prolin an Position 13 keinen Einfluss auf die Position der ersten TM1 hat. In Abbildung 40 ist die mögliche Positionierung der TM1 von Kcv-wt und den Kcv-Mutanten in der Membran schematisch dargestellt.



**Abb. 40: Mögliche Auswirkung der Mutationen an der TM1 von Kcv auf die Positionierung dieser Domäne in der Membran.** Dargestellt sind die Mutationen (rot) und die Lage der TM1 in der Membran [Die rot-gestrichelte Linie zeigt die abweichende Krümmung der TM1 vom wt (schwarz-gestrichelte Linie) an].

Erwähnenswert ist, dass ein Austausch von Prolin gegen Glycin den Wildtyp Phentyp ebenfalls verändert und zu einer zusätzlichen Zeit- und Spannungsabhängigen Komponente führt. Dies ist deshalb so erwähnenswert, da Glycin zu einer Destabilisierung von  $\alpha$ -helikalen Strukturen tendiert und durchaus die Rolle des Prolins im Kcv-Protein übernehmen könnte (O'Neil und DeGrado, 1990). Jedoch erzwingt Glycin nicht wie Prolin eine Knickstelle im Protein. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Knick im Kcv-Protein erzwungen werden muss, weil möglicherweise die Aminosäurezusammensetzung stromaufwärts von Prolin nicht ausreichend ist, um die notwendige Krümmung und die daraus folgende Positionierung der N-terminalen Domäne in der Membran-Cytoplasma-Grenzschicht zu gewährleisten. Bei dem Kaliumkanal KcsA scheint die Aminosäure Glycin für die erforderliche Krümmung ausreichend zu sein. Der Knick wird in KcsA womöglich durch eine thermodynamisch günstigere Situation der stromaufwärts liegenden Aminosäuren unterstützt.

Insgesamt weisen die Daten darauf hin, dass durch einen kompletten Austausch von Prolin und infolgedessen einer Verlängerung der helikalen-Struktur von TM1 ein Einwärtsstrom durch Kcv gefördert wird. In diesem extremen Fall kommt es zu einer zusätzlichen zeit- und spannungsabhängigen Komponente und somit zu einem Verlust der Inhibierung bei negativen

Spannungen. Wenn nur TM1 verlängert wird, zeigt der Kanal lediglich eine zusätzliche zeitabhängige Komponente; die Inhibierung des Offenkanalstroms bei extrem negativen Spannungen bleibt bestehen. Eine alleinige Verlängerung der TM1 reicht also nicht aus, um den Inhibierungseffekt zu eliminieren.

Ein Austausch von Prolin an Position 13 gegen die negativ geladene Aminosäure Aspartat (Kcv-P13D) führte zu einem Verlust der Kanalleitfähigkeit. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen, dass eine zusätzliche negative Ladung im N-Terminus zu einem Verlust der Kcv-Aktivität führt und der Ladungszustand der N-terminalen Domäne von Kcv wichtig für die Funktionalität des Kanals ist. Auch eine positiv geladene Aminosäure an dieser Position (Kcv-P13R) wird nicht toleriert. Dieses Ergebnis zeigt, dass womöglich der gesamte Ladungszustand in der N-terminalen Region wichtig ist.

In einem weiteren Versuch wurde gezeigt, dass ein Wiedereinfügen von Prolin in die nicht funktionelle Mutante Kcv-P13D die typische Kcv-Leitfähigkeit nicht wiederherstellen kann. Dies deutet darauf hin, dass in der Tat die eingeführte Ladung an dieser Position zu einem Verlust der Kcv-Aktivität führt und nicht das Entfernen der Aminosäure Prolin an Position 13.

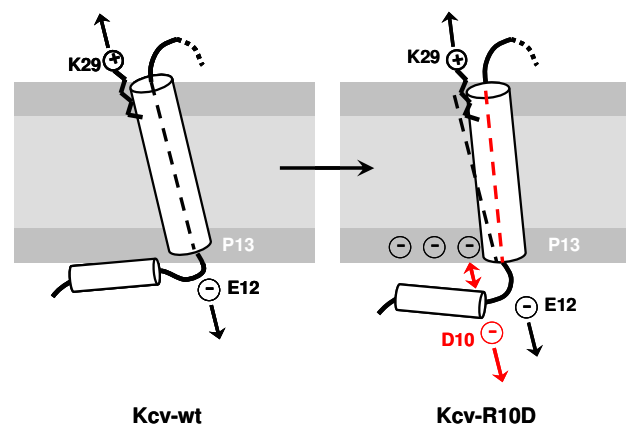
### **Positionierung von TM1 in der Membran**

Der Zusammenhang zwischen dem Verlust der Kcv-Leitfähigkeit bei der  $\Delta N11$ -Kcv-Mutante und der veränderten Kanaleigenschaft der P13-Mutanten ist nicht direkt ersichtlich. Es kann angenommen werden, dass die funktionelle Rolle von Prolin an Position 13 im Kcv-Protein, einen Knick zu erzeugen, nur Sinn macht, wenn das Protein stromaufwärts von dieser Krümmung auf irgendeine Art in der Membran verankert wird. Die kritische Länge des N-Terminus könnte genau dieses Erfordernis eines Verankerns von TM1 in der Membran erfüllen. In diesem Fall scheint die Länge an erforderlichen Aminosäuren wichtiger zu sein als die Aminosäurezusammensetzung. Die hohe Energie, die benötigt wird um die notwendigen Aminosäuren ( $^9\text{TRTE}^{12}$ ) in die Membran zu überführen (White, 2003; Hessa *et al.*, 2005) könnte gewährleisten, dass diese Verankerung tatsächlich an der Membran-Cytoplasma-Grenzschicht und nicht innerhalb der Membran positioniert ist. Der kumulative Wert für die apparente Freie Energie ( $\Delta G_{\text{app}}$ ) für den Transfer dieses Peptids ( $^9\text{TRTE}^{12}$ ) von der Wasser-Membran-Grenzschicht ins Innere der Membran liegt bei  $\Delta G_{\text{app}} > 3,6$  kcal/mol (nach Wimley und White, 1996). Dieser positive Wert deutet an, dass ein Übergang dieses Segments ins Membraninnere sehr unwahrscheinlich ist. Diese N-terminale Domäne könnte somit als Membrananker auf der cytosolischen Seite für eine präzise Positionierung von TM1 in der Membran verantwortlich sein.

Es ist interessant zu erwähnen, dass sich am C-terminalen Ende von TM1 die Aminosäure Lysin (K29) befindet (Abb. 41). Sehr häufig flankieren Lysinreste die Transmembransegmen-

te. Die Seitengruppe dieser positiv geladenen Aminosäure ermöglicht das so genannte *Snorkeling*, d.h. der aliphatische Teil bleibt in der hydrophoben Umgebung der Membran, während die positiv geladene Aminogruppe sich in der polaren Oberfläche positioniert (Killian und Heijne, 2000; Strandberg und Killian, 2003). Dieses *Snorkeling* vergrößert die effektive hydrophobe Länge des Proteinsegments und ist ein möglicher Mechanismus für relativ kurze Segmente einen hydrophoben *Mismatch* auszugleichen. Solch ein hydrophobes *Mismatch* kann die Aktivität und Struktur eines Membranproteins beeinflussen. Somit hat die Dicke der Membran, in die das Protein inseriert ist, durchaus einen Einfluss auf das Kanalverhalten. So haben z.B. Untersuchungen an dem BK-Kanal gezeigt, dass eine Änderung der Lipidkettenlänge die Leitfähigkeit des Kanals beeinflusste (Yuan *et al.*, 2004).

Im Falle von Kcv ist es durchaus möglich, dass der Lysinrest auf der extrazellulären Seite (K29) zusammen mit dem Membrananker auf der cytosolischen Seite für eine präzise Positionierung von TM1 in der Membran verantwortlich ist. Auch die negativ geladene Aminosäure Glutamat kurz vor Beginn der TM1 (E12) könnte zu dieser präzisen Positionierung beitragen. (Abb. 41) Negativ geladene Aminosäuren haben nur kurze Seitengruppen und werden von den negativ geladenen Phosphatgruppen der Membran abgestoßen. Deshalb gilt anzunehmen, dass diese Aminosäuren keine Interaktionen an der Lipid-Wasser-Grenzschicht eingehen, sondern eher eine wässrige Umgebung bevorzugen. Im Falle von Kcv könnte die negativ geladene Aminosäure Glutamat vor Beginn der TM1 zu einer mechanischen Spannung in der TM1 führen, da sie einen Zug in Richtung wässrige Phase ausübt (Abb. 41). Dies könnte zu einer noch präziseren Positionierung der ersten Transmembrandomäne in der Membran führen.



**Abb. 41: Mögliche Positionierung der N-terminalen Domäne und der TM1 von Kcv-wt und der Kcv-R10D-Mutante.** Am C-terminalen Ende von TM1 ist die Aminosäure Lysin (K29) dargestellt, die ein so genanntes *Snorkeling* macht. Die negativ geladene Aminosäure Glutamat (E12) und in der Kcv-R10D-Mutante zusätzlich die Aminosäure Aspartat (D10) üben möglicherweise einen Zug in Richtung wässriger Phase aus, was in der Mutante zu einer Änderung der Positionierung von TM1 in der Membran führen kann (rot-gestrichelte Linie). Außerdem können zusätzliche negative Ladungen in der N-terminalen Region von Kcv zu einer Abstoßung dieser Region durch die negativ geladenen Lipidkopfguppen führen.

Diese Ansicht lässt sich mit dem Ergebnis vereinbaren, dass jedes Einfügen einer weiteren negativ geladenen Aminosäure in der N-terminalen Region sowohl an Position 13 als auch weiter entfernt vom Prolin den Kanal inaktiv macht. Diese Manipulation könnte zu einem Anstieg der Spannung in der TM1-Orientierung führen und infolgedessen zu einem Kanal, der nicht mehr in der Lage ist  $K^+$  zu leiten (Abb. 41).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse scheint es, dass die Kanalaktivität, bei einer Zunahme an hydrophober Länge und daraus folgender Entspannung von TM1, begünstigt ist. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Stärke der Interaktionen zwischen der N-terminalen Region von Kcv an der Membran-Wasser-Grenzschicht die Flexibilität der Konformation des Kanals und scheinbar auch das *Gating* beeinflussen.

### **Wichtigkeit von TM1 am Kanal-Gating**

Die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse ist konsistent mit früheren Befunden, die auf die Wichtigkeit von TM1 am Kanal-Gating hinweisen. Die Arbeit an Kcv und seinen Homologen haben gezeigt, dass Veränderungen in der TM1-Domäne einen drastischen Effekt auf das *Gating* des Kanals haben (Gazzarrini *et al.*, 2004). Gleichartige Folgerungen ergeben sich aus Analysen von willkürlichen Mutanten von dem G-Protein gekoppelten Einwärtsgerichteter GIRK2 (Bichet *et al.*, 2004). Anhand dieser Ergebnisse wurde spekuliert, dass großräumige Bewegungen und weit reichende Interaktionen zwischen TM1 und anderen Kanal-domänen das Kanal-Gating und die Ionenpermeation beeinflussen können. Da Kcv offenbar kein anderes *Gate* besitzt wie den Selektivitätsfilter, wird jede der beabsichtigten Änderung in der TM1-Länge in eine Konformationsänderung der Porenregion übertragen. In diesem Fall stimmen die hier präsentierten Daten mit der Hypothese überein, dass TM1 indirekt in die Permeations- und *Gating*-Prozesse in der Pore eingreift. In der Tat wurde die vorgeschlagene Bewegung von TM1 bei Untersuchungen von Konformationsänderungen des bakteriellen Kaliumkanals KcsA während pH-abhängigem *Gating* entdeckt. Spektroskopische Daten zeigen eine signifikante Rotationsbewegung von TM1 mit einer Neigung größtenteils in Richtung des N-terminalen Endes (Perozo *et al.*, 1999).

Die vorgelegten Daten tragen dazu bei, die Funktion von komplexeren Kaliumkanälen zu verstehen. Die Ergebnisse implizieren, dass eine Versetzung des cytoplasmatischen Ankers von TM1 auf atomarer Ebene zu einer Veränderung der Kanalaktivität führt. Dies könnte einen Mechanismus unterstützen, bei dem eine Konformationsänderung des cytoplasmatischen N-Terminus gekoppelt ist mit einer Änderung des Kanal-Gatings. So wird z.B. in den  $K_{ATP}$ -Kanälen die ATP-Bindung an cytoplasmatische Bereiche auf die Transmembranelemente übertragen, was zu einem Schließen des Kanals führt (Antcliff *et al.*, 2005). Es wird postuliert, dass die Bindung von ATP an Kir6.2 möglicherweise zu einem Wechsel der Interaktionen

zwischen den Untereinheiten führt und eine Bewegung der N-terminalen *slide-helix* auslöst was zu einem Schließen des Kanals führt (Antcliff *et al.*, 2005).

Dieser Mechanismus könnte auch eine Erklärung dafür geben, dass eine Bewegung der S4-Domäne in 6TM-Kanälen auf die Kanalpore übertragen wird. Die Kaliumkanäle vom 6TM-Typ besitzen einen Spannungssensor (S4-Domäne), der eine Rolle in der Spannungsabhängigkeit des Ionentransports spielt (Liman *et al.*, 1991). Die Änderung des Membranpotentials führt zu einer Bewegung dieses Proteinabschnitts und dadurch zum Öffnen oder Schließen des Kanals. Es wird vermutet, dass die Bewegung des Spannungssensors durch mechanische Kopplung auf das *Gate* übertragen wird (Yifrach und MacKinnon, 2002). Der intrazelluläre S4-S5-Linker, der die vierte mit der fünften Transmembrandomäne verbindet, ist ein potentieller Kandidat für die strukturelle Verbindung zwischen dem Spannungssensor und dem Aktivierungs-*Gate* in Kv- und den ähnlich gebauten HCN(*hyperpolarization-activated and cyclic-nucleotide-gated*)-Kanälen und scheint wichtig für das Kanal-*Gating* zu sein (Lu *et al.*, 2002). Mutationen in dieser Region beeinflussen die Spannungsabhängigkeit und Kinetik der Aktivierung in Kv Kanälen (Chen *et al.*, 2001; Sanguinetti *et al.*, 1999). Die NMR-Struktur des S4-S5 Segments vom *Shaker*-Kaliumkanal weist auf eine amphipathische  $\alpha$ -helikale Konformation hin (Ohlenschläger, 2002) und ist äquivalent zu der N-terminalen Domäne der 2TM-Kanäle. Die vorliegenden Ergebnisse liefern auch Hinweise für das Verständnis von der Funktion komplexerer K<sup>+</sup>-Kanäle. Die Daten implizieren einen Mechanismus, bei dem ein Konformationswechsel des cytoplasmatischen N-Terminus, z.B. als Folge von Ligandenbindung oder Bewegung des Spannungssensors bei spannungsabhängigen Kv-Kanälen, in eine Änderung des *Gatings* der Kanalpore übertragen wird.

Das Homologiemodell, die Sekundärstrukturvorhersage und die NMR-Daten des N-Terminus von Kcv weisen auch auf eine helikale Konformation und somit auf eine mögliche Lage dieser Domäne parallel zur Membran-Cytoplasma-Grenzschicht hin. Es gilt anzunehmen, dass Bewegungen dieses Proteinabschnittes über die TM1 auf die Pore übertragen werden. Jede Änderung in sowohl der notwendigen Aminosäuren (<sup>9</sup>TRTE<sup>12</sup>) in dem cytoplasmatischen N-Terminus als auch in der Länge der TM1 haben einen Einfluss auf das Kanalverhalten von Kcv.

### **Einfluss der Membrandicke am Kanal-Gating**

Eine Schlüsselbeobachtung in dieser Arbeit war, dass eine Verlängerung der N-terminalen Transmembrandomäne (TM1) in dem minimalen Kaliumkanal Kcv zu einem zusätzlichen spannungs- und zeitabhängigen Strom führt. Dies spricht für eine kritische Rolle in der Wechselwirkung zwischen der TM1 und der Lipid-Doppelschicht bei der K<sup>+</sup>-Kanalfunktion. Für Modell-Transmembranproteine wurde gezeigt, dass eine Übereinstimmung zwischen der hydrophoben Länge des Peptids und der Membrandicke energetisch günstig sind. Dies verhindert einen so genannten hydrophoben *Mismatch* (Planque und Killian, 2003). Jede Veränderung in

der relativen Dicke der Membran in Bezug zum Protein könnte möglicherweise zu einer Konformationsänderung des Proteins führen. In einigen Fällen konnte gezeigt werden, dass solche Konformationsänderungen infolge solcher Protein-Bilayer-*Mismatches* die Aktivität von Transportproteinen beeinflusst (Domene *et al.*, 2003, Dumas *et al.*, 1999). Dies schließt auch das *Gating* von stretch-aktivierten Kanälen ein (Perozo *et al.*, 2002). Die hier vorliegenden Daten zeigen, dass auch in Kcv ein Zusammenspiel zwischen TM1 und der Membrandicke relevant für das *Gating* des minimalen viralen K<sup>+</sup>-Kanals ist.

Schon frühere Experimente haben gezeigt, dass es Unterschiede zwischen dem Verhalten der Kcv Leitfähigkeit gibt, je nachdem ob sie in HEK293-Zellen oder in *Xenopus* Oocyten exprimiert sind (Moroni *et al.*, 2002). Der Hauptunterschied ist, dass Kcv im Oocytensystem bei negativen Spannungen einen zeitabhängigen Einwärtsstrom zeigt, welcher auf eine instantane Komponente folgt. Diese zeitabhängige Aktivierung ist bei Kcv, wenn er in HEK293-Zellen exprimiert ist, nicht vorhanden. Jedoch wurde in dieser Arbeit eine zusätzliche zeitabhängige Komponente in Kcv-Mutanten mit verlängerter TM1 auch in HEK293-Zellen gefunden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Plasmamembran der Oocyten möglicherweise dünner ist, als die von menschlichen Zellen. Dies wird durch weitere Ergebnisse gestützt, die zeigen, dass eine Verkürzung der effektiven hydrophoben Länge der TM1 (Kcv-2aa) einen großen Effekt auf die Kanaleigenschaften von Kcv in Oocyten hat. Die Expression von Kcv-2aa in *Xenopus* Oocyten führte zu einer Kaliumkanalaktivität, die sich in charakteristischen Merkmalen von Kcv in Oocyten unterscheidet: i) Veränderte Kinetik mit Verlust der zeitabhängige Komponente, ii) Verringerung der K<sup>+</sup>-Selektivität iii) niedrigere Selektivität für K<sup>+</sup> gegenüber Na<sup>+</sup> und iv) geringere Sensitivität zu dem Kaliumkanalblocker Ba<sup>2+</sup>. Interessant war, dass diese Mutante, wie Kcv-wt exprimiert in HEK293-Zellen, keine zeitabhängige Komponente und eine geringere K<sup>+</sup>-Selektivität zeigte. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass die Dicke der Membran, in die das Protein inseriert ist, durchaus einen Einfluss auf das Kanalverhalten hat und die Plasmamembran der Oocyten möglicherweise dünner ist, als die von menschlichen Zellen. Dies könnte die Unterschiede in der Kcv Leitfähigkeit, je nachdem ob der Kanal in HEK293-Zellen oder in *Xenopus* Oocyten exprimiert ist, erklären.

Die Experimente in Oocyten zeigen auch, dass eine Verlängerung der TM1 in dem Expressionssystem *Xenopus* Oocyten keine Auswirkung auf die Kanalaktivität hat. Es zeigten sich keine erkennbaren Unterschiede der Kcv-P13A-Mutante und Kcv-wt exprimiert in Oocyten. Die Leitfähigkeit, die Spannungsabhängigkeit, die Sensitivität zu dem Kaliumkanalblocker Ba<sup>2+</sup> und die Selektivität für K<sup>+</sup> gegenüber Na<sup>+</sup> der Kcv-P13A-Mutante unterschieden sich nicht merklich vom Kcv-wt. Dies lässt den Schluss zu, dass die TM1 von Kcv-wt in der Oocytmembran bereits die optimale Länge besitzt und dass in der Tat die Dicke der Membran, in welche der Kanal inseriert wird, einen Effekt auf die Kanaleigenschaften hat.

Eine Transmembrandomäne wird sich in der Membran so orientieren, dass der hydrophobe *Mismatch* minimiert ist. In diesem Zusammenhang ist es nahe liegend, dass jede Verlängerung oder Verkürzung von TM1 in Beziehung zur Membrandicke zu einer Konformationsänderung führt. Die Unterschiede von Kcv in HEK293-Zellen und in *Xenopus* Oocyten weisen darauf hin, dass in der Tat die relative Länge von TM1 in Beziehung zur Membrandicke entscheidend ist für Unterschiede in der Konformation und dass im Fall von Kcv dieser Konformationswechsel von TM1 eine Veränderung im Kanal-*Gating* zur Folge hat.

### Resümee und Ausblick

Die Daten unterstützen ein Modell, in welchem die Krümmung und die daraus folgende Verankerung und Positionierung von TM1 wichtig für den *Gating*-Mechanismus des Kanals sind. Die kritische Länge des N-Terminus könnte genau dieses Erfordernis eines Verankerns von TM1 in der Membran erfüllen. Jede Verlängerung von TM1, entweder durch Entfernen der  $\alpha$ -Helix brechenden Aminosäure Prolin an Position 13 oder durch Einfügen einer zusätzlichen Aminosäure in die TM1, begünstigt die Kanalaktivität. Von der Rolle der geladenen Aminosäuren an der Lipid-Wasser-Grenzschicht kann vermutet werden, dass diese Manipulation zu einem verstärkten Ziehen des transmembranen Segments in die wässrige Phase führt. Daraus folgt ein Abfall an hydrophober Länge von TM1, was eine Inaktivierung des Kanals zur Folge hat. Auch die relative Länge von TM1 in Beziehung zur Membrandicke ist entscheidend für Unterschiede in der Konformation des Kanals. Im Fall von Kcv führt dieser Konformationswechsel von TM1 zu einer Veränderung im Kanal-*Gating*. Dies spricht für eine kritische Rolle in der Wechselwirkung zwischen der TM1 und der Lipid-Doppelschicht bei der  $K^+$ -Kanalfunktion. Struktur-Funktions-Beziehungen müssen somit als Zusammenspiel zwischen dem Protein und der Lipiddoppelschicht verstanden werden.

Mit Hilfe der vorliegenden Ergebnisse kann auch die Funktion von komplexeren  $K^+$ -Kanälen verstanden werden. Die Daten implizieren einen Mechanismus bei dem ein Konformationswechsel des cytoplasmatischen N-Terminus in eine Änderung des *Gatings* der Kanalpore übertragen wird.

Aus der beobachteten Auswirkung der Länge der TM1 und der Beteiligung dieser Domäne am Kanal-*Gating* ergeben sich Ansatzpunkte für weitere Studien. Dabei wäre es interessant die Orientierung der TM1 in der Membran zu untersuchen, da scheinbar jede Änderung in der Lage der TM1 in der Membran einen Einfluss auf die Kanalaktivität hat. Damit verbunden wäre die Untersuchung, wie ein Konformationswechsel in der TM1 auf das *Gate* übertragen wird und wie die Lage der TM1 Einfluss nimmt auf den *Gating*-Prozess des Kanals. Hierbei könnten Computerunterstützte molekulare Modellierung und Simulationsstudien einen wesentlichen Beitrag leisten, um weitere Informationen über Konformationsänderungen zu erhalten.

Auch wäre es interessant das Zusammenspiel zwischen dem Protein und der Lipiddoppelschicht noch weiter zu untersuchen. Zu diesem Zweck könnten beispielsweise Bilayer-Experimente an Kcv mit unterschiedlichen Lipidtypen durchgeführt werden, um zu untersuchen inwieweit eine Änderung in der Membrandicke einen Einfluss auf die Kanalaktivität hat. Für diese Untersuchungen bietet der minimale virale Kaliumkanal Kcv ein geeignetes Testsystem und trägt dazu bei die Funktion von komplexeren Kaliumkanälen besser zu verstehen.

## 5. Zusammenfassung

Der Kaliumkanal Kcv aus dem *Paramecium bursaria* Chlorellavirus bildet den kleinsten funktionellen Kaliumkanal und ist deshalb als Minimalmodell für die Aufklärung von Struktur-Funktions-Zusammenhängen bei Kaliumkanalproteinen besonders geeignet. In dieser Arbeit wurde der Frage nach der Rolle des kurzen cytoplasmatischen N-Terminus von Kcv in Kombination mit seinem Interaktionspartner, der ersten Transmembrandomäne (TM1), nachgegangen. Es konnte gezeigt werden, dass ein Entfernen des cytoplasmatischen N-Terminus zu einem Verlust an Kanalaktivität führt. Die Untersuchungen an Kcv-Mutanten mit verkürzter N-terminaler Domäne deuten auf eine kritische Länge dieser Region hin. Die ersten 7 Aminosäuren nach dem initialen Methionin erscheinen weder für die Oligomerisierung noch für die Funktion essentiell zu sein. Jedes weitere Verkürzen führte zu einer drastischen Reduktion bis hin zu einem Verlust der Kcv-typischen Leitfähigkeit. In weiteren Experimenten zeigte sich, dass die Länge an erforderlichen Aminosäuren wichtiger ist, als die Aminosäurezusammensetzung. Lediglich die Einfügung von zusätzlichen negativ geladenen Aminosäuren führt zu einem Verlust der Kanalaktivität.

Neben der kritischen Länge der N-terminalen Domäne zeigen die vorliegenden Befunde auch die Bedeutung eines Winkels, der durch die Aminosäure Prolin bewirkt wird und die N-terminale Domäne mit der TM1 verbindet. Die Daten unterstützen ein Modell, in welchem die Krümmung und die daraus folgende Verankerung und Positionierung von TM1 in der Membran wichtig für den *Gating*-Mechanismus des Kanals sind. Dieses Modell wird gestützt durch die Befunde, dass:

- i) die kritische Länge des cytoplasmatischen N-Terminus genau dieses Erfordernis einer Verankerung von TM1 in der Membran reflektiert,
- ii) eine Verlängerung bzw. Verkürzung der  $\alpha$ -helikalen Struktur von TM1 zu einer zusätzlichen zeit- und spannungsabhängigen Komponente bzw. zu deren Verschwinden führt,
- iii) ein Einfügen einer zusätzlichen negativ geladenen Aminosäure im essentiellen N-terminalen Bereich zum Verlust an Kanalaktivität führt.

Diese Manipulationen an dem minimalen Kaliumkanal Kcv zeigen, dass die Kanalaktivität durch eine relativ lange effektive hydrophobe Länge von TM1 begünstigt wird; eine verringerte hydrophobe Länge von TM1 dagegen führt zu einer Abnahme an Kanalaktivität.

Da bei Kcv lediglich der Selektivitätsfilter der Pore als *Gate* in Frage kommt kann ferner geschlossen werden, dass jede Änderung in der Orientierung von TM1 in der Membran in eine Konformationsänderung des Poren-*Gates* übertragen wird. Ein solcher mechanischer Kopplungsmechanismus bietet die Möglichkeit zur Übertragung von Konformationsänderungen im Cytoplasma auf Prozesse von Ionen-Permeation und Kanal-*Gating*.

## 6. Literaturverzeichnis

**Antcliff JF, Haider S, Proks P, Sansom MS, Ashcroft FM** (2005) Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the KATP channel Kir6.2 subunit. *EMBO J.* 24(2), 229-239

**Bertani G** (1952) Studies on lysogenesis. *J. Bacteriol.* 62, 293-300

**Bichet D, Haass FA, Jan LY** (2003) Merging functional studies with structures of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 957-967

**Biggin PC, Sansom MS** (2002) Open-state models of a potassium channel. *Biophys J.* 83(4), 1867-1876.

**Brink-van der Laan E, Chupin V, Killian JA, de Kruijff B** (2004) Stability of KcsA Tetramer Depends on Membrane Lateral Pressure. *Biochemistry* 43, 4240-4250

**Carrasco** (1995) Modification of membrane permeability by animal viruses. *Adva. Virus Res.* 45, 61-112

**Chalfie M** (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.

**Chen MY, Maldarelli F, Karczewski MK, Willey RL, Strebel K** (1993) Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpu Protein Induces Degradation of CD4 In Vitro: the Cytoplasmic Domain of CD4 Contributes to Vpu Sensitivity. *Journal of Virology* 67, 3877-3884

**Chen J, Mitcheson JS, Tristani-Firouzi M, Lin M, Sanguinetti MC** (2001) The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels. *PNAS* 98, 11277-11282

**Chen J, Cassar SC, Zhang D, Gopalakrishnan M** (2005) A novel potassium channel encoded by Ectocarpus siliculosus virus. *Biochem Biophys Res Commun.* 326(4), 887-893

**Cordes FS, Bright JN, Sansom MSP** (2002) Proline-induced Distortions of Transmembrane Helices. *J. Mol. Biol.* 323: 951-960

**Cortes DM, Perozo E** (1997) Structural Dynamics of the *Streptomyces lividans* K<sup>+</sup> Channel (SKC1): Oligomeric Stoichiometry and Stability. *Biochemistry* 36, 10343-10352

**Cortes DM, Cuello LG, Perozo E** (2001) Molecular architecture of full-length KcsA: role of cytoplasmic domains in ion permeation and activation gating. *J. Gen. Physiol.* 117:165-180

**Delaroque N, Müller DG, Bothe G, Pohl T, Knippers R, Boland W** (2001) The complete DNA sequence of the Ectocarpus siliculosus virus EsV-1 genome. *Virology* 287, 112-132

**Demmers JAA, VanDalen A, de Kruijff B, Heck AJR, Killian JA** (2003) Interaction of the K<sup>+</sup> channel KcsA with membrane phospholipids as studied by ESI mass spectrometry. *FEBS Letters* 541, 28-32

**Domene C, Sansom MSP** (2003) A potassium channel, ions and water: simulation studies based on the high resolution x-ray structure of KcsA. *Biophys. J.* 85, 2787-2800

- Domene C, Bond P, Sansom MSP** (2003) Membrane protein simulation: ion channels and bacterial outer membrane proteins. *Adv. Protein Chem.* 66, 159-193
- Domene C, Bond P, Deol SS, Sansom MSP** (2003) Lipid-protein interactions and the membrane/water interfacial region. *J. Am. Chem. Soc.* 125,14966-14967
- Domene C, Grottesi A, Sansom MSP** (2004) Filter Flexibility and Distortion in a Bacterial Inward Rectifier K<sup>+</sup> Channel: Simulation Studies of KirBac1.1. *Biophys. J.* 87, 256-267
- Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R** (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77
- Drain P, Li L, Wang J** (1998) KATP channel inhibition by ATP requires distinct functional domains of the cytoplasmic C terminus of the poreforming subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13953-13958
- Dumas F, Lebrun MC, Tocanne JF** (1999) Is the protein/lipid hydrophobic matching principle relevant to membrane organization and functions? *FEBS Letters* 458, 271-277
- Ewart GD, Mills K, Cox GB, Gage PW** (2002) Amiloride derivatives block ion channel activity and enhancement of virus-like particle budding caused by HIV-1 protein Vpu. *Eur Biophys J.* 31, 26-35
- Gazzarrini S, Kang M, Van Etten JL, Tayefeh S, Kast SM, DiFrancesco D, Thiel G, Moroni A** (2004) Long-distance interactions within the potassium channel pore are revealed by molecular diversity of viral proteins. *JBC* 279, 28443-28449
- Gazzarrini S, Severino M, Lombardi M, Morandi M, DiFrancesco D, Van Etten JL, Thiel G, Moroni A** (2003) The viral potassium channel Kcv: structural and functional features. *FEBS Lett.* 552, 12-16
- Gazzarrini S, Van Etten JL, DiFrancesco D, Thiel G, Moroni A** (2002) Voltage-Dependence of Virus-encoded Miniature K<sup>+</sup> Channel Kcv. *J. Membrane Biol.* 187, 15-25
- Goldstein SA, Price LA, Rosenthal DN, Pausch MH** (1996) ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 13256-13261
- Gonzales ME, Carrasco L** (2003) Viroporins. *FEBS Lett.* 552, 28-34
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R** (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-72.
- Hammil 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
- Hanahan D** (1985) DNA Cloning, D.Glover (Editor). IRL Press, Ltd., London

- Hattan D, Nesti E, Cachero TG, Morielli AD** (2002) Tyrosine Phosphorylation of Kv1.2 Modulates Its Interaction with the Actin-binding Protein Cortactin. *JBC* 277, 38596–38606
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R** (1994) Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys. J.* 66, 1061-1067
- Heginbotham L, Odessey, E Miller C** (1997) Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K<sup>+</sup> channel. *Biochemistry* 36, 85-100
- Hessa T, Kim H, Bihlmaier K, Lundin C, Boekel J, Andersson H, Nilsson I, White SH, von Heijne G** (2005) Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature* 433, 377-381
- Hilken G, Jglauer F, Richter HJ** (1997) Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* als Labortier: Biologie, Haltung, Zucht und experimentelle Nutzung. Enke, Stuttgart
- Hille B** (2001) Ion channels of excitable membranes. 3. Aufl., Sinauer Associates Inc., Sunderland
- Hopkins CR** (1992) Selective membrane protein trafficking: vectorial flow and filter. *Trends Biochem Sci.* 17(1), 27-32.
- Jan LY, Jan YN** (1992) Structural elements involved in specific K<sup>+</sup> channel functions. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 537-555
- Jiang B, Sun X, Cao K, Wang R** (2002) Endogenous K<sub>v</sub> channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Mol. Cell. Biochem.* 238, 69-79
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R** (2002a) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, 417, 515-522
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R** (2002b) The open pore conformation of potassium channels *Nature* 417, 523-526
- Kang M, Graves M, Mehmel M, Moroni A, Gazzarrini S, Thiel G, Gurnon JR, VanEtten JL** (2004a) Genetic diversity in chlorella viruses flanking *kcv*, a gene that encodes a potassium ion channel protein. *Virology* 326, 150-159
- Kang M, Moroni A, Gazzarrini S, DiFrancesco D, Thiel G, Severino M, VanEtten JL** (2004b) Small potassium ion channel proteins encoded by chlorella viruses. *PNAS* 101, 5318-5324
- Karschin A, Wischmeyer E, Döring F, Karschin C** (1997) Kaliumeinwärtsgerichteter - ursprüngliche Kanalstrukturen als Basis funktioneller Vielfalt. *Neuroforum* 4, 127-32
- Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK, Goldstein SA** (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376, 690-95
- Killian JA, von Heijne G** (2000) How proteins adopt to a membrane-water interface. *Trends Biochem. Sci.* 25, 429-434
- Killian JA** (2003) Synthetic peptides as models for intrinsic membrane proteins. *FEBS Lett.* 555, 134-

- Kochendoerfer GG, Jones DH, Lee S, Oblatt-Montal M, Opella SJ, Montal M** (2004) Functional Characterization and NMR Spectroscopy on Full-Length Vpu from HIV-1 Prepared by Total Chemical Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 2439-2446
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY** (1992) Primary structure and function of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362, 127-133
- Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahmann T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, Doyle DA** (2003) Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 300, 1922-1926
- Labro AJ, Raes, AL, Bellens I, Ottschytch N, Snyders DJ** (2003) Gating of *Shaker*-type channels requires the flexibility of S6 caused by prolines. *JBC* 278, 50724-50731
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lamb RA, Pinto LH** (1997) Do Vpu and Vpr of human immunodeficiency virus type 1 and NB of influenza B virus have ion channel activities in the viral life cycles? *Virology* 229,1-11
- Li M, Jan YN, Jan LY** (1992) Specification of subunit assembly by the hydrophilic aminoterminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* 257, 1225-1230
- Liman ER, Hess P, Weaver F, Koren G** (1991) Voltage-sensing residues in the S4 region of mammalian K<sup>+</sup> channel. *Nature* 352, 752-756
- Liman ER, Tytgat J, Hess P** (1992) Subunits stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9, 861-871
- Liu YS, Somporpisut P, Perozo E** (2001) Structure of the KcsA channel intracellular gate in the open state. *Nat Struct Biol.* 8(10), 883-887.
- Lu H, Marti T, Booth PJ** (2001) Proline Residues in Transmembrane  $\alpha$  Helices Affect the Folding of Bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* 308, 437-446
- Lu Z, Klem AM, Ramu Y** (2002) Coupling between Voltage Sensors and Activation Gate in Voltage-gated K Channels. *J. Gen. Physiol.* 120, 663-676
- Ma D, Zerangue N, Lin Y, Collins A, Yu M, Jan Y, Jan L** (2001) Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* 291, 316-319
- MacKinnon R** (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* 555, 62-65
- MacKinnon R, Zhou M, Morais-Cabral JH, Kaufman A** (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414, 43-49
- MacKinnon R, Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S** (2001) Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 411, 657-661

- MacKinnon R, Zhou M, Morais-Cabral JH** (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature* 414, 37-42
- Magidovich E, Yifrach O** (2004) Conserved Gating Hinge in Ligand- and Voltage-Dependent K<sup>+</sup> Channels. *Biochemistry* 43, 13242-13247
- Magleby KL** (2003) Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. *J Gen Physiol.* 121(2), 81-96.
- Martin K, Helenius A** (1991) Transport of Incoming Influenza Virus Nucleocapsids into the Nucleus. *Journal of Virology* 65, 232-244
- Mehmel M, Rothermel M, Meckel T, VanEtten JL, Moroni A, Thiel G** (2003) Possible function for virus encoded K<sup>+</sup> channel Kcv in the replication of chlorella virus PBCV-1. *FEBS Letters* 552, 7-11
- Mehmel M** (2004) Studien zur Funktion von Kaliumkanalproteinen aus Viren Eukaryotischer Algen (Phycodnaviridae). Doktorarbeit an der Technischen Universität Darmstadt
- Miller C** (1992) Ion channel structure and function. *Science* 258, 240-241
- Minor DL, Masseling SJ, Jan YN, Jan LY** (1999) Transmembrane Structure of an Inwardly Rectifying Potassium Channel. *Cell* 96, 879-891
- Minor DL, Lin YF, Mobley BC, Avelar A, Jan YN, Jan LY, Berger JM** (2000) The polar T1 interface is linked to conformational changes that open the voltage-gated potassium channel. *Cell* 102, 657-670
- Morais-Cabral JA, Zhou Y, MacKinnon R** (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature* 414, 37-42
- Moroni A, Viscomi C, Sangiorgio V, Pagliuca C, Meckel T, Horvath F, Gazzarrini S, Valbuzzi P, Van Etten JL, DiFrancesco D, Thiel G** (2002) The short N-terminus is required for functional expression of the virus-encoded miniature K<sup>+</sup> channel Kcv. *FEBS Lett.* 530, 65-69
- Neher und Sakmann** (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle muscle fibres. *Nature* 260, 799-802
- Nishimura N, Balch W** (1997) A diacidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* 277, 556-558
- Niu X, Qian X, Magleby KL** (2004) Linker-Gating Ring Complex as Passive Spring and Ca<sup>2+</sup>-Dependent Machine for a Voltage and Ca<sup>2+</sup>-Activated Potassium Channel. *Neuron* 42, 745-756
- Ohlenschläger O, Hojo H, Ramachandran R, Görlach M, Haris PI** (2002) Three-Dimensional Structure of the S4-S5 Segment of the Shaker Potassium Channel. *Biophysical Journal* 82, 2995-3002
- O'Neil KT, DeGrado WF** (1990) A Thermodynamic Scale for the Helix-Forming Tendencies of the Commonly Occurring Amino Acids. *Science* 250: 646-651

- Pagliuca C** (2005) Doktorarbeit: Purification & Reconstitution of the Virus-encoded K<sup>+</sup> Channel Kcv.
- Papazian DM** (2004) BK Channels: The Spring between Sensor and Gate. *Neuron* 42(5), 699-701
- Perozo E, Cortes DM, Cuello LG** (1998) Three-dimensional architecture and gating mechanism of a K<sup>+</sup> channel studied by EPR spectroscopy. *Nat Struct Biol.* 5(6), 459-469
- Perozo E, Cortes DM, Cuello LG** (1999) Structural Rearrangements Underlying K<sup>+</sup>-Channel Activation Gating. *Science* 285: 73-78
- Petersen KR, Nerbonne JM** (1999) Expression environment determines K<sup>+</sup> current properties: Kv1 and Kv4  $\alpha$ -subunit-induced K<sup>+</sup> currents in mammalian cell lines and cardiac myocytes. *Pflügers Arch.* 437, 381-392
- Piller SC, Ewart GD, Premkumar A, Cox GB, Gage PW** (1996) Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 111-115
- Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA** (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69(3), 517-528
- Planque MRR, Killian JA** (2003) Protein/lipid interactions studied with designed transmembrane peptides: role of hydrophobic matching and interfacial anchoring. *Molecular Membrane Biology* 20, 271-284
- Plugge B, Gazzarrini S, Nelson M, Cerana R, Van Etten JL, Derst C, DiFrancesco D, Moroni A, Thiel G** (2000) A potassium channel protein encoded by chlorella virus PBCV-1. *Science* 287, 1641-1644
- Popov N, Schmitt M, Schulzek S, Matthies H** (1975) Eine störungsfreie Mikromethode zur Bestimmung des Proteingehalts in Gewebehomogenaten. *Acta Biol. Med. Ger.* 34, 1441-1446
- Prasher DC** (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanguinetti MC, Xu QP** (1999) Mutations of the S4-S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology* 514, 667-675
- Schubert U, Ferrer-Montiel AV, Oblatt-Montal M, Henklein P, Strebel K, Montal M** (1996) Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS Letters* 398, 12-18
- Schulze D, Krauter T, Fritzenschaft H, Soom M, Baukrowitz T** (2003) Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) Modulation of ATP and pH Sensitivity in Kir Channels. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 10500-10505

- Shrivastava IH und Sansom MSP** (2002) Molecular dynamics simulations and KcsA channel gating. *Eur Biophys J* (2002) 31, 207–216
- Shyng SL, Cukras CA, Harwood J, Nichols CG** (2000) Structural Determinants of PIP<sub>2</sub> Regulation of Inward Rectifier KATP Channels. *J. Gen. Physiol.* 116, 599-607
- Stockklauser C, Klöcker N** (2003) Surface Expression of Inward Rectifier Potassium Channels Is Controlled by Selective Golgi Export. *J. Biological Chemistry*, 278, 17000-17005
- Strandberg E, Killian JA** (2003) Snorkeling of lysine side chains in transmembrane helices: how easy can it get? *FEBS Letters* 544, 69-73
- Sunstrom NA, Premkumar LS, Premkumar A, Ewart G, Cox GB, Gage PW** (1996) Ion Channels Formed by NB, an Influenza B Virus Protein. *J. Membrane Biol.* 150, 127–132
- Tieleman DP, Biggin PC, Smith GR, Sansom MS** (2001) Simulation approaches to ion channel structure-function relationships. *Q Rev Biophys.* 34(4), 473-561
- Tillman TS, Cascio M** (2003) Effects of membrane lipids on ion channel structure and function. *Cell Biochem Biophys.* 38(2), 161-190
- Tosteson MT, Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA** (1994) Reconstitution of the influenza virus M2 ion channel in lipid bilayers. *Journal of Membrane Biology* 142, 117-26
- Tucker SJ, Gribble FM, Proks P, Trapp S, Ryder TJ, Haug T, Reimann F, Ashcroft FM** (1998) Molecular determinants of KATP channel inhibition by ATP. *The EMBO Journal* 17, 3290-3296
- Ulmschneider MB, Sansom MSP** (2001) Amino acid distributions in integral membrane protein structures. *Biochimica et Biophysica Acta* 1512, 1-14
- Valiyaveetil FI, Zhou Y, MacKinnon R** (2002) Lipids in the Structure, Folding, and Function of the KcsA K<sup>+</sup> Channel. *Biochemistry* 41, 10771-10777
- Van Dalen A, van der Laan M, Driessen AJM, Killian JA, de Kruijff B** (2002) Components required for membrane assembly of newly synthesized K channel KcsA. *FEBS Letters* 511, 51-58
- VanDongen AMJ** (2004) K channel gating by an affinity-switching selectivity filter. *PNAS* 101, 3248-3252
- Van Etten JL, Graves MV, Müller DG, Boland W, Delaroque N** (2002) Phycodnaviridae - large DNA algal viruses. *Arch. Virol.* 147, 1479-1516
- Wimley WC, White SH** (1996) Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol.* 3, 842-848
- White SH** (2003) Translocons, thermodynamics, and the folding of membrane proteins. *FEBS Letters* 555, 116-121
- Xiao J, Zhen XG, Yang J** (2003) Localization of PIP<sub>2</sub> activation gate in inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Nat Neurosci.* 6(8), 811-818

- Yau WM, Wimley WC, Gawrisch K, White SH** (1998) The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry* 37, 14713-14718
- Yi BA, Lin YF, Jan YN, Jan LY** (2001) Yeast Screen for Constitutively Active Mutant G Protein-Activated Potassium Channels. *Neuron* 29, 657-667
- Yi BA, Minor DL, Lin YF, Jan YN, Jan LY** (2001) Controlling potassium channel activities: Interplay between the membrane and intracellular factors. *PNAS* 98, 11016-11023
- Yifrach O, MacKinnon R** (2002) Energetics of Pore Opening in a Voltage-Gated K Channel. *Cell* 111, 231-239
- Yu SP, Kerchner GA** (1998) Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *NeurosciRes* 52, 612-617
- Yuan C, O'Connell RJ, Feinberg-Zadek PL, Johnston LJ, Treistman SN** (2004) Bilayer Thickness Modulates the Conductance of the BK Channel in Model Membranes. *Biophysical Journal* 86, 3620-3633
- Zerangue N, Jan YN, Jan LY** (2000) An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional Shaker channels lacking T1. *PNAS* 97, 3591-3595
- Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY** (1999) A New ER Trafficking Signal Regulates the Subunit Stoichiometry of Plasma Membrane  $K_{ATP}$  Channels *Neuron* 22, 537-548
- Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S, MacKinnon R** (2001) Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 411, 657-661
- Zheng J und Sigworth FJ** (1997) Selectivity Changes during Activation of Mutant Shaker Potassium Channels. *J. Gen. Physiol.* 110, 101-117

## Anhang

## A Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BK	<i>Large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels</i>
CHO-Zellen	<i>Chinese hamster ovary cells</i>
CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cRNA	<i>copy</i> RNA
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
EAG	<i>Ether-à-Gogo Kanäle</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EsV-1	Ectocarpus siliculosus Virus
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (aus <i>Aequoria victoria</i> )
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEK293	<i>human embryonic kidney cells</i> (Zelllinie 293)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N-(2-Ethansulfonsäure)
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
Ii	instantaner Strom
Iss	stationärer (engl. <i>steady-state</i> ) Strom
I	Strom
It	<i>Tail</i> -Strom
KcsA	Kaliumkanal aus <i>Streptomyces lividans</i>
Kcv	Kaliumkanal aus Chlorellavirus
kDa	Kilodalton
Kesv	Kaliumkanal aus Ectocarpusvirus
Kir	Kaliumkanäle ( <i>inward rectifier</i> )
KirBac1.1	Kaliumkanal aus <i>Burkholderia pseudomallei</i>
Kv	Kaliumkanäle ( <i>voltage gated</i> )
LB	Luria Bertani-Medium
MthK	Kaliumkanal aus <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
N	Anzahl der Versuchswiederholungen
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
P	Porenregion
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBCV-1	Paramecium bursaria Chlorella Virus 1
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pfu	Enzym aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
RCK	<i>regulator of K<sup>+</sup> conductance</i>
RNA	Ribonucleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor
Tab.	Tabelle
Taq	Enzym aus <i>Thermophilus aquaticus</i>

TBS	Tris gepufferte Saline
TM	Transmembran (-region)
M	Transmembran (-region)
TM1	Erste Transmembrandomäne
U	Unit
mV	Millivolt
V	Spannung
Vp	Virusprotein
wt	Wildtyp

## B Aminosäuren, Ein- und Dreibuchstabencode

A	Ala	Alanin	N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
D	Asp	Asparaginsäure	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	V	Val	Valin
I	Ile	Isoleucin	W	Trp	Tryptophan
K	Lys	Lysin	Y	Tyr	Tyrosin
L	Leu	Leucin	X		unbestimmt
M	Met	Methionin			

## C Oligonukleotide

### Oligonukleotide

$\Delta$ N3-Kcv-for	5' GGATAGATCTATGAGTAAATTTCTAACGCGAAC 3'
$\Delta$ N3-Kcv-rev	5' CCTAGAATTCTAAAGTTAGAACGATGAAGAAC 3'
$\Delta$ N7-Kcv-for	5' GGATAGATCTATGACGCGAACTGAACCATTC 3'
$\Delta$ N7-Kcv-rev	5' CCTAGAATTCTAAAGTTAGAACGATGAAGAAC 3'
$\Delta$ N8-Kcv-for	5' GGATAGATCTATGCGAACTGAACCATTC 3'
$\Delta$ N8-Kcv-rev	5' CCTAGAATTCTAAAGTTAGAACGATGAAGAAC 3'
$\Delta$ N9-Kcv-for	5' GGATAGATCTATGACTGAACCATTCATG 3'
$\Delta$ N9-Kcv-rev	5' CCTAGAATTCTAAAGTTAGAACGATGAAGAAC 3'
$\Delta$ N11-Kcv-for	5' GGATAGATCTATGCCATTCATGATACATC 3'
$\Delta$ N11-Kcv-rev	5' CCTAGAATTCTAAAGTTAGAACGATGAAGAAC 3'
$\Delta$ N7-Kcv-T9A-for	5' GGATAGATCTATGGCACGAACTGAACCTTTCATG 3'
$\Delta$ N7-Kcv-T9A-rev	5' CCTAGAATTCTAAAGTTAGAACGATGAAGAAC 3'

$\Delta$ N7-Kcv-T9S-for 5' GGATAGATCTATGTCTCGAACTGAACCATTCATG 3'  
 $\Delta$ N7-Kcv-T9S-rev 5' CCTAGAATTCTAAAGTTAGAACGATGAAGAAC 3'

$\Delta$ N7-Kcv-T9D-for 5' CCGGACTCAGATCTATGGATCGAACTGAACCTTTCATG 3'  
 $\Delta$ N7-Kcv-T9D-rev 5' CATGAATGGTTCAGTTCGATCCATAGATCTGAGTCCGG 3'

### Mutagenesis primer

$\Delta$ N7-Kcv-R10D-for 5' CCGGACTCAGATCTATGACGGATACTGAACCATTCATG 3'  
 $\Delta$ N7-Kcv-R10D-rev 5' CATGAATGGTTCAGTATCCGTCATAGATCTGAGTCCGG 3'

Kcv-R10D-for 5' GTAAATTTCTAACGGATACTGAACCATTCATG 3'  
 Kcv-R10D-rev 5' CATGAATGGTTCAGTATCCGTTAGAAATTTAC 3'

Kcv-P13A-for 5' CTAACGCGAACTGAAGCATTTCATGATACATCTCTTTATTC 3'  
 Kcv-P13A-rev 5' GAATAAAGAGATGTATCATGAATGCTTCAGTTCGCGTTAG 3'

Kcv-P13G-for 5' CTAACGCGAACTGAAGGATTTCATGATACATCTCTTTATTC 3'  
 Kcv-P13G-rev 5' GAATAAAGAGATGTATCATGAATCCTTCAGTTCGCGTTAG 3'

Kcv-P13R-for 5' CTAACGCGAACTGAACGATTTCATGATACATCTCTTTATTC 3'  
 Kcv-P13R-rev 5' GAATAAAGAGATGTATCATGAATCGTTCAGTTCGCGTTAG 3'

Kcv-P13D-for 5' CTAACGCGAACTGAAGACTTCATGATACATCTCTTTATTC 3'  
 Kcv-P13D-rev 5' GAATAAAGAGATGTATCATGAAGTCTTCAGTTCGCGTTAG 3'

Kcv-P13L-for 5' CTAACGCGAACTGAACTCTTCATGATACATCTCTTTATTC 3'  
 Kcv-P13L-rev 5' GAATAAAGAGATGTATCATGAAGAGTTCAGTTCGCGTTAG 3'

Kcv-P13F-for 5' CTAACGCGAACTGAATTCTTCATGATACATCTCTTTATTC 3'  
 Kcv-P13F-rev 5' GAATAAAGAGATGTATCATGAAGAATTCAGTTCGCGTTAG 3'

Kcv-P13A+1P-for 5' CGCGAACTGAAGCACCATTTCATGATACATCTC 3'  
 Kcv-P13A+1P-rev 5' GAGATGTATCATGAATGGTGCTTCAGTTCGCG 3'

Kcv-P13A-1P-for 5' CTAACGCGAACTGAACCAGCATTTCATGATACATC 3'  
 Kcv-P13A-1P-rev 5' GATGTATCATGAATGCTGGTTCAGTTCGCGTTAG 3'

Kcv-P13D+1P-for 5' CGCGAACTGAAGACCCATTTCATGATACATCTC 3'  
 Kcv-P13D+1P-rev 5' GAGATGTATCATGAATGGGTCTTCAGTTCGCG 3'

Kcv-P13D-1P-for 5' CTAACGCGAACTGAACCAGACTTCATGATACATC 3'  
 Kcv-P13D-1P-rev 5' GATGTATCATGAAGTCTGGTTCAGTTCGCGTTAG 3'

Kcv-A16-for 5' CTGAACCATTTCATGGCAATACATCTCTTTATTCTCG 3'  
 Kcv-A16-rev 5' CGAGAATAAAGAGATGTATTGCCATGAATGGTTCAG 5'

Kcv-2aa for 5' CGAACTGAACCATTCCATCTCTTTATTCTCGC 3'  
 Kcv-2aa-rev 5' GCGAGAATAAAGAGATGGAATGGTTCAGTTCG 3'

**Primer für die Sequenzanalyse**

pEGFP-N2 Sequenzierungsprimer

5' CCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACC 3'

pSGEM Sequenzierungsprimer

5' GTAATACGACTCACTATAGGG 3'

Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikationen eingegangen:

Brigitte Hertel, Sascha Tayefeh, Mario Mehmel, Stefan M. Kast, James Van Etten, Anna Moroni, Gerhard Thiel. Distortion of the first transmembrane domain alters gating of miniature K<sup>+</sup> channel Kcv. Bei *Biophysical Journal* eingereicht.

Mario Mehmel, Brigitte Hertel, Tobias Meckel, Nicolas Delaroque, James L Van Etten, Anna Moroni, Gerhard Thiel. Potassium channels of distantly related algal viruses: implications for channel evolution and function. Bei *FEBS Lett.* eingereicht.

Brigitte Hertel, Ferenc Horváth, Barnabás Wodala, Anna Moroni, Annette Hurst, Gerhard Thiel. KAT1 inactivates at sub-millimolar concentrations of external potassium. Bei *Plant, Cell & Environment* eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. Gerhard Thiel am Institut für Botanik der Technischen Universität Darmstadt durchgeführt und unter dem Geschäftszeichen TH 558/8-1 sowie TH 558/8-2 von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Brigitte Hertel, Darmstadt, den 03.05.2005

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Hertel
Vorname	Brigitte
Geburtstag	01.06.1973
Geburtsort	Darmstadt
Familienstand	verheiratet

## Schulbildung

08/1979 – 06/1989	Grundschule, Förderstufe und Realschule der Mornewegschule in Darmstadt
09/1992 – 12/1995	Abendgymnasium Darmstadt Abschluß: Allgemeine Hochschulreife, Gesamtnote 1,3

## Berufsausbildung

09/1989 – 05/1992	Ausbildung zur Chemielaborantin bei der Firma Röhm GmbH in Darmstadt
-------------------	--

## Berufliche Tätigkeit

06/1992 – 09/1996	Tätigkeit als Chemielaborantin bei der Firma Röhm GmbH in Darmstadt
07/1998 – 01/2002	Während des Hauptstudiums zeitweise tätig als Studentische Hilfsassistentin am Institut für Botanik an der Technischen Universität Darmstadt

## Studium

10/1996 – 02/2002	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt
06/2001 – 02/2002	Diplomarbeit an der Technischen Universität Darmstadt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thiel mit dem Thema: Kationenspezifisches Schaltverhalten von KAT1, einem Kalium-Einwärtsgleichrichter aus <i>Arabidopsis thaliana</i> Abschluss: Diplom, Gesamtnote 1,0
04/2002 – 07/2005	Promotionsstudium am Botanischen Institut der Technischen Universität Darmstadt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thiel
11/2004 – 12/2004	Forschungsaufenthalt an der Universität Milano, Italien, im Labor von Dr. Anna Moroni