

Universität Ulm
Abteilung für Angewandte Physiologie
Prof. Dr. Dr. h. c. Frank Lehmann-Horn

**Der Effekt von K^+ und Rb^+ auf die
Wirkung von Verapamil in
spannungsabhängigen *hKv1.3* K^+ Kanälen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Zerrin Kuras
Aschaffenburg
2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Grissmer

2. Berichterstatter: PD Dr. Johannes Zanzinger

Tag der Promotion: 17.02.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 1 -
1.1 Der spannungsabhängige K ⁺ Kanal Kv1.3: Struktur	- 1 -
1.1.1 Struktur von Kv1.3.....	- 1 -
1.1.2 Kanalzustände	- 3 -
1.2 Kv1.3: Vorkommen und Bedeutung	- 5 -
1.2.1 Vorkommen der Kv1.3 Untereinheiten	- 5 -
1.2.2 Physiologische Rolle von Kv1.3 in der Aktivierung von T-Zellen.....	- 5 -
1.3 Kv1.3 : Pharmakologie.....	- 6 -
1.4 Strukturelle Veränderung verursacht durch Kationen	- 7 -
1.5 Spannungsabhängigkeit der Verapamil Hin- und Rückreaktion.....	- 8 -
2. Zielsetzung	- 10 -
3. Material und Methoden	- 11 -
3.1 Molekularbiologie	- 11 -
3.1.1 Lösungen und Reagenzien	- 11 -
3.1.2 DNA-Klone	- 11 -
3.1.3 Transformation	- 12 -
3.1.4 Isolierung der Plasmid-DNA	- 12 -
3.2 Zellkultur	- 12 -
3.2.1 Lösungen und Reagenzien	- 12 -
3.2.2 Kultivierung der COS-7 Zelllinie	- 13 -
3.2.3 Transfektion mit Plasmid-DNA	- 13 -
3.3 Elektrophysiologie.....	- 14 -
3.3.1 Lösungen und Reagenzien	- 14 -
3.3.2 Vorbereitung der Zellen.....	- 14 -
3.3.3 Aufbau der Patch-Clamp-Apparatur	- 15 -
3.3.4 Versuchsdurchführung	- 15 -
3.3.5 Auswertung der Daten.....	- 16 -
3.3.5.1 Dosis-Wirkungskurve	- 16 -
3.3.5.2 Simulation der Tailströme.....	- 17 -

4. Ergebnisse	- 18 -
4.1 Auswirkungen von intrazellulärem K^+ und Rb^+ auf die Verapamil-Affinität im Wildtyp hKv1.3 Kanal und im mutierten Kanal H399T	- 18 -
4.1.1 Wildtyp hKv1.3	- 18 -
4.1.2 H399T	- 24 -
4.1.3 Zusammenfassung von 4.1	- 28 -
4.2 Charakterisierung der Verapamil Rückreaktion (Verlassen der Bindungsstelle)	- 29 -
4.2.1 Tail-Ströme mit hohem K^+ in der extrazellulären Lösung	- 31 -
4.2.2 Tail-Ströme mit hohem Rb^+ in der extrazellulären Lösung	- 35 -
4.2.3 Einfluss vom spannungsabhängigen Eintritt von K^+ auf die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion	- 39 -
4.2.4 Einfluss der Dauer der Depolarisation auf den zeitlichen Verlauf des Tail-Stromes in H399T Kanälen	- 42 -
5. Diskussion	- 45 -
5.1 Rolle der intrazellulären K^+ und Rb^+ auf die Verapamil Affinität.....	- 45 -
5.2 Die Spannungsabhängigkeit der Verapamil Rückreaktion (off-rate)	- 47 -
5.3 Beobachtung des zweiten offenen Zustandes mithilfe der Tail-Ströme ..	- 49 -
5.4 Vergleich mit anderen Kanälen.....	- 51 -
6. Zusammenfassung	- 53 -
7. Literaturverzeichnis	- 55 -

Abkürzungsverzeichnis

2YT	Vollmedium	H	Histidin
4β	Deaktivierungs- Ratenkonstante	<i>h</i>	Mensch-
A	Ampère	HEPES	N-2- Hydroxyethylpiperaz-in- N'-2-ethansulfonsäure
Amp	Ampicillin	I	inaktivierter Zustand
bp	Basenpaare	IB	inaktiviert-blockierter Zustand
C	geschlossener (closed) Zustand	<i>I</i>	Strom
°C	Grad Celsius	<i>I_{norm}</i>	normalisierter Strom
Ca ²⁺	Calciumionen	<i>IC₅₀</i>	Konzentration des halbmaximalen inhibitorischen Effekts
CaCl ₂	Calciumchlorid	<i>k</i>	Hinreaktionskonstante
Cl ⁻	Chloridionen	K ⁺	Kaliumionen
CO ₂	Kohlendioxid	[K ⁺] _e	Extrazelluläre Kalium- Lösung
CRAC	Calcium-release activated calcium channel	[K ⁺] _i	Intrazelluläre Kalium- Lösung
D	Asparaginsäure	KCl	Kaliumchlorid
D-MEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium	KF	Kaliumfluorid
DMSO	Dimethylsulfoxid	kHz	Kilohertz
DNA	Desoxyribonukleinsäure	KOH	Kaliumhydroxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Kv	spannungsabhängiger Kaliumkanal
EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure	<i>ℓ</i>	Rückreaktionskonstante
EGTA	Ethylenglykoltetra- essigsäure	l	Liter
FBS	Fötale Rinderserum	LB	Flüssignährmedium
g	Gramm	M	mol/l
G	Glycin	<i>m</i>	Maus-
GFP	Green fluorescent protein	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
GYG	Glycin-Tyrosin-Glycin	MgTX	Margatoxin

min	Minute	TEA	Tetraethylammonium
n	Anzahl von Versuchen	TMAF	Tetramethylammonium- Fluorid
n	Hill-Koeffizient		
$[\text{Na}^+]_e$	Extrazelluläre Natrium- Lösung	Upm	Umdrehungen pro Minute
NaCl	Natriumchlorid	V	Volt
NaOH	Natriumhydroxid	$V_{1/2}$	Spannung der halbmaximalen
O	offener Zustand		Aktivierung
OB	offen-blockierter Zustand	V_m	Haltepotential
Ω	Ohm	Vol	Volumen
Osm	Osmolarität	wt	Wildtyp
PAP	Phenoxyalkoxy psoralen	Y	Tyrosin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung		
r	Ratte		
Rb^+	Rubidiumionen		
$[\text{Rb}^+]_e$	Extrazelluläre Rubidium-Lösung		
$[\text{Rb}^+]_i$	Intrazelluläre Rubidium- Lösung		
RbCl	Rubidiumchlorid		
RbOH	Rubidiumhydroxid		
s	Sekunde		
S1-S6	Transmembranhelix S1- S6		
ShK	<i>Stichodactyla helianthus</i> Toxin		
τ_h	Inaktivierungszeit- konstante		
τ_i	Deaktivierungszeit- konstante		
T1	Tetramerisierungs- Domäne 1		

1. Einleitung

Zellen sind umgeben von einer Fettschicht, der Zellmembran, und grenzen sich damit von ihrer äußeren Umgebung und von anderen Zellen ab. Für die meisten polaren, wasserlöslichen Substanzen, insbesondere für alle Ionen, ist diese Zellmembran eine praktisch unüberwindbare Barriere. Dennoch können auch Ionen und polare Moleküle Membranen passieren, allerdings nur mit Hilfe von Proteinen, die in die Membran eingelagert sind. Einige dieser Proteine in der Zellmembran besitzen enge, hochselektive Poren. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Ionenkanäle, die meist nur für bestimmte Ionen permeabel sind, z.B. hauptsächlich für Na^+ oder K^+ oder Ca^{2+} oder Cl^- . Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit spannungsabhängigen K^+ Kanälen, den Kv1.3 Kanälen. Die Kv1.3 Kanäle lassen unter physiologischen Bedingungen nur K^+ durch und spielen beispielsweise eine wichtige Rolle in der Aktivierung der T-Lymphozyten. Die Blockade der Kv1.3 Kanäle könnte eine wichtige Bedeutung in der Therapie von z.B. Multiple Sklerose besitzen. Die Einleitung soll einen Einblick schaffen, wie die Kv1.3 Kanäle aufgebaut sind, wo sie vorkommen und was für eine physiologische Rolle sie besitzen und wodurch sie inhibiert werden können.

1.1 Der spannungsabhängige K^+ Kanal Kv1.3: Struktur

1.1.1 Struktur von Kv1.3

Der spannungsabhängige K^+ Kanal Kv1.3 gehört zu der Familie der *Shaker*-verwandten K^+ Kanäle (Grissmer et al., 1990). Erste Modelle zur Aufklärung des strukturellen Aufbaus von Kv1.3 wurden aus elektrophysiologischen Daten abgeleitet. Seit einigen Jahren haben zur weiteren Aufklärung der Struktur insbesondere Kristallstrukturen von Kaliumkanälen beigetragen, wie z.B. des bakteriellen K^+ Kanals *KcsA* (Doyle et al., 1998) oder des spannungsabhängigen K^+ Kanals Kv1.2 (Abb. 1, Long et al., 2005).

Der Kv1.3 Kanal ist aus vier symmetrisch angeordneten Untereinheiten aufgebaut. Das fertige Kanaltetramer besteht entweder aus vier identischen Untereinheiten (Homotetramer) oder aus einer Kombination von verschiedenen Untereinheiten (Heterotetramer). Jede Untereinheit ist wiederum aus sechs Transmembranhelices, S1 – S6, aufgebaut (Abb. 1). Die Segmente S1 – S4 bilden

die Spannungssensor-Domäne, wobei der Hauptteil des Spannungssensors von S4 gebildet wird. Das Segment S4 besitzt in jeder dritten Position eine positive Ladung, meistens von einem Arginin (Perozo et al., 1994). Die Ladungen in S4 sind verantwortlich für die Aktivierung (Öffnung) der Kanäle, die eine Veränderung im Membranpotential wahrnehmen können.

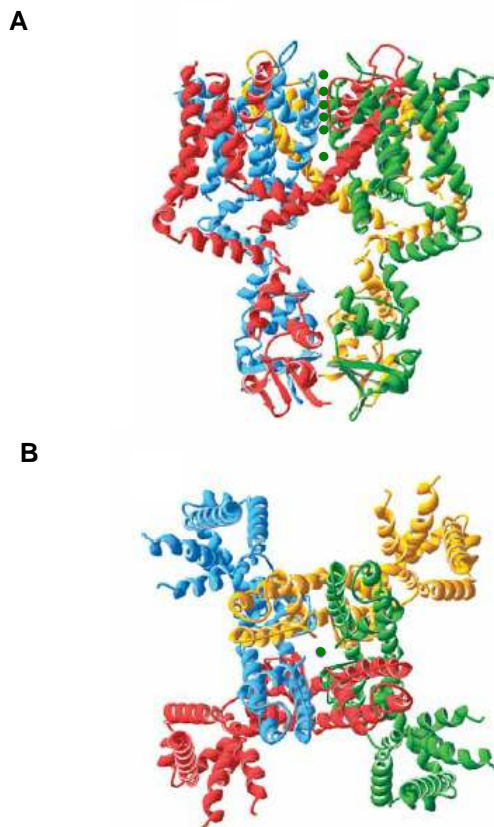


Abbildung 1: Darstellung eines Modells vom Tetramer (vier Untereinheiten) des Kv1.2 Kanals. Jede Untereinheit hat eine eigene Farbe. Kaliumionen sind als kleine grüne Kreise dargestellt. (A) Der Kanal ist von der Seite gezeigt mit der extrazellulären Seite oben und der intrazellulären Seite unten. (B) Ansicht von oben (extrazellulären Seite). (Quelle: Long et al., 2005)

Zwischen den Segmenten S5 und S6 befindet sich die Porenschleife des Kanals (gelb, Abb. 2A). Dabei handelt es sich um einen Proteinabschnitt mit einer kurzen Helix-Domäne. Dieser Bereich im Protein enthält ein für alle Kaliumkanäle charakteristisches Sequenzmotiv (GYGD). Im funktionellen Kanal bilden die Porenschleifen aller vier Untereinheiten den so genannten Selektivitätsfilter, der einen selektiven Durchtritt der Kaliumionen ermöglicht (Abb. 2B).

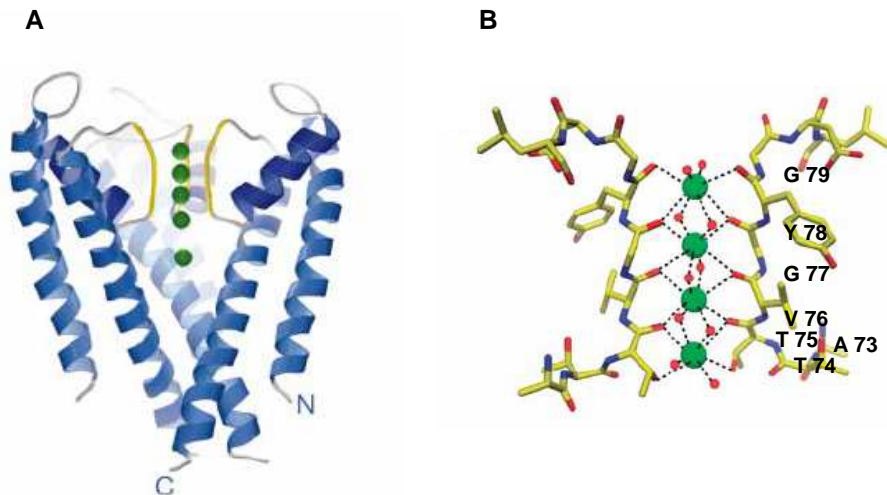


Abbildung 2: (A) Darstellung der Transmembranhelices S5 – S6 von drei Untereinheiten im KcsA Kanal mit dem Selektivitätsfilter (gelb). K^+ (grüne Kreise) können an vier Bindungsstellen im Selektivitätsfilter binden und im wasser-gefüllten Bereich (unteres K^+ ; Morais-Cabral et al., 2001). (B) Nahaufnahme des Selektivitätsfilters (Gouaux et al., 2005) im KcsA Kanal, zur einfachen Darstellung sind nur zwei Untereinheiten gezeigt. Gezeigt sind die Bindungsstellen für K^+ und die Kaliumionen (grün) innerhalb des Selektivitätsfilters.

Der Selektivitätsfilter enthält vier Bindungsstellen für Kationen (Abb. 2B). Unter physiologischen Bedingungen sind zwei der vier Bindungsstellen für K^+ im Selektivitätsfilter besetzt und zwar entweder in der 1 – 3 Konfiguration oder in der 2 – 4 Konfiguration (Zhou et al., 2003). Auf der extrazellulären Seite über dem Selektivitätsfilter befindet sich eine trichterförmige Erweiterung (äußeres Vestibül) und unter dem Selektivitätsfilter befindet sich ein wassergefüllter intrazellulärer Bereich (inneres Vestibül), der von den Teilen der Segmente S5 und insbesondere S6 ausgekleidet wird. Der Bereich zwischen den Segmenten S5 und S6 ist essentiell für den selektiven Durchtritt der Kaliumionen. Die Segmente S5 und S6 müssen sich während der Aktivierung bewegen, um so den Durchtritt der Ionen zu ermöglichen.

1.1.2 Kanalzustände

Spannungsabhängige Kaliumkanäle können aufgrund von Änderungen im Membranpotential ihren Zustand verändern. Die Kv1.3 Kanäle liegen bei negativen Potentialen in einem geschlossenen nicht-leitenden Zustand (closed, C) vor. Die Kanäle gehen bei depolarisierenden Potentialen von dem geschlossenen

(C) in den offenen leitenden Zustand (O) über (Abb. 3A). Die Wildtyp Kanäle zeichnen sich dadurch aus, dass sie von dem offenen Zustand, wenn das depolarisierende Potential lang genug ist, in den nicht-leitenden C-Typ inaktivierten Zustand (I) übergehen.

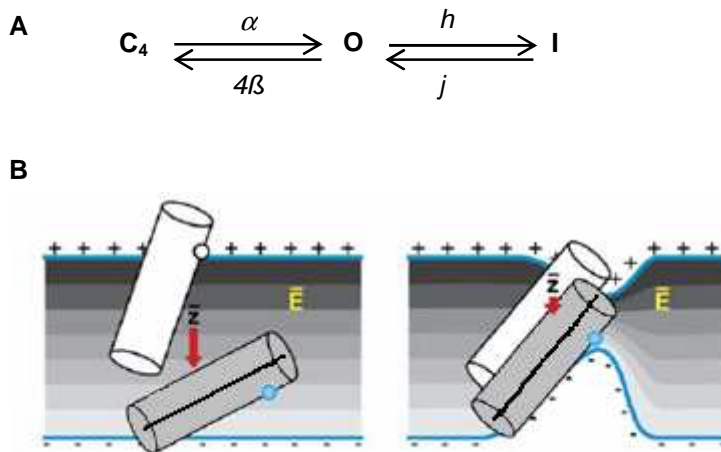


Abbildung 3: (A) Vereinfachte Darstellung der Übergänge zwischen den einzelnen Kanalzuständen des hKv1.3. C₄ beschreibt den letzten geschlossenen Zustand nach der Hodgkin-Huxley-Kinetik, O steht für den offenen, leitenden und I für den C-typ inaktivierten Zustand. (B) Zwei verschiedene Modelle der S4 Bewegung. S4 ist als Zylinder dargestellt im offenen (weiß) und im geschlossenen (grau) Zustand. z stellt die vertikale Komponente der S4 Bewegung dar und die grauen Schattierungen zeigen den Abfall des elektrischen Potentials in der Membran. E stellt ein starkes lokales elektrisches Feld dar (Tombola et al., 2005).

Damit der Übergang C → O während der Aktivierung erfolgen kann, müssen Bewegungen der Segmente, insbesondere S4 – S6, stattfinden. Da S4 den Hauptteil des Spannungssensors bildet, ist die Position von S4 im Kanal für die Aktivierung entscheidend. Es gibt verschiedene Hypothesen für die S4 Bewegung. In Abbildung 3B sind zwei mögliche Modelle für die Bewegung der Segmente S4 dargestellt. Das erste Modell (Abb. 3B links) zeigt eine starke Bewegung von S4 durch die Membran (Jiang et al., 2003), während im zweiten Modell (Abb. 3B rechts) nur eine kleine Bewegung von S4 stattfindet (Tombola et al., 2005). Die Bewegung von S4 führt zu Bewegungen in den Segmenten S5 und S6, wodurch die Pore geöffnet wird. Nachdem die Kanäle im aktivierten Zustand sind, können die Ionen durch die Kanäle gehen.

1.2 Kv1.3: Vorkommen und Bedeutung

1.2.1 Vorkommen der Kv1.3 Untereinheiten

Die Kv1.3 Kanal Untereinheiten werden in zahlreichen Geweben und Zellen exprimiert. Kv1.3 Untereinheiten wurde schon beispielsweise in T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, Adipozyten, Retina, olfaktorische Neurone, Niere und im Gehirn nachgewiesen. In den meisten Fällen liegt der Kv1.3 Kanal als Heterotetramer vor, d.h. die vorhandenen vier Untereinheiten sind nicht nur vom Kv1.3 sondern auch von anderen Kv1.x Kanälen gestellt. Im Gegensatz dazu gibt es auch Homotetramere, deren vier Untereinheiten ausschließlich vom Kv1.3 Kanal gebildet werden. Der Kv1.3 Kanal wurde zuerst in Lymphozyten als Homotetramer beschrieben (Grissmer et al., 1990). In diesen Zellen haben die Kv1.3 Kanäle eine wichtige Rolle in den frühen Stadien der Aktivierung der T-Lymphozyten (DeCoursey et al., 1984).

1.2.2 Physiologische Rolle von Kv1.3 in der Aktivierung von T-Zellen

Kv1.3 Kanäle spielen eine wichtige physiologische Rolle bei der Aktivierung der T-Lymphozyten. Diese Aktivierung wird durch den Kontakt von T-Zellen mit dem Antigen auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen induziert. Infolgedessen werden mehrere Signalkaskaden ausgelöst, wovon einige abhängig sind von funktionellen Kv1.3 Kanälen (siehe unten). Schon 1984 konnte durch die Blockade von Kv1.3 Kanälen gezeigt werden, dass die Kv1.3 Kanäle für die Aktivierung der T-Lymphozyten notwendig sind (DeCoursey et al., 1984).

Für eine optimale Aktivierung der T-Lymphozyten muss für einige Stunden der Ca^{2+} Einstrom in die Zellen gewährleistet sein (Fanger et al., 2001). Durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern des endoplasmatischen Reticulums, werden spannungsunabhängige Ca^{2+} Kanäle aktiviert, die so genannten CRAC Kanäle (calcium-release-activated calcium channels). Die Ca^{2+} Kanäle führen zu einem Ca^{2+} Einstrom in das Zellinnere. Dieser Ca^{2+} Einstrom ist größer, wenn die Zelle hyperpolarisiert ist (Beeton et al., 2001). Die spannungsabhängigen Kv1.3 Kanäle können die Zellen hyperpolarisieren und sorgen so indirekt für einen ausreichenden Ca^{2+} Einstrom (Fanger et al., 2001). Somit sind die Kv1.3 Kanäle die sekundären Regulatoren der Ca^{2+} Signalwege in humanen T-Lymphozyten. Eine Blockade der Kv1.3

Kanäle führt damit zur Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung. Deswegen könnte eine Blockade von Kv1.3 Kanälen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von Autoimmunkrankheiten wie Multiple Sklerose (Wulff et al., 2003) oder Typ-1 Diabetes (Atkinson et al., 1994) spielen. Welche Blocker und Inhibitoren der Kv1.3 Kanäle schon bekannt sind, möchte ich im Folgenden kurz darstellen.

1.3 Kv1.3 : Pharmakologie

Eine Eigenschaft von Kv1.3 Kanälen, die benutzt werden kann, um sie von anderen Kv Kanälen zu unterscheiden, ist deren ausgeprägte Pharmakologie. Der Strom durch Kv1.3 Kanäle kann beispielsweise blockiert werden von Peptidinhibitoren wie Skorpiontoxine (z.B. Charybdotoxin siehe Price et al., 1989; Margatoxin siehe Garcia-Calvo et al., 1993; Agitoxin siehe Gross et al., 1994; Kaliotoxin siehe Grissmer et al., 1994) und von Toxinen von Seeanemonen (z.B. ShK siehe Kalman et al., 1998).

Margatoxin (MgTX) ist das potenteste Skorpiontoxin und blockiert die Ströme durch die Kv1.3 Kanäle mit einem IC_{50} von 30 pM, während die Ströme durch die Kv1.6 Kanäle oder die *Shaker* Kanäle mit einem IC_{50} von 5 nM bzw. 150 nM blockiert werden (Garcia-Calvo et al., 1993). Somit blockiert MgTX die Kv1.3 Kanäle ~150-mal stärker als in Kv1.6 Kanälen bzw. 5000-mal stärker als in *Shaker* Kanälen. Des Weiteren wurden bei einer Konzentration von 200 nM MgTX keine Reduzierung der Ströme in Kv1.5 und Kv3.1 Kanälen beobachtet (Garcia-Calvo et al., 1993). Auch in diesen Kanälen wirkt MgTX >7000-mal schlechter als in Kv1.3 Kanälen. Das Seeanemontoxin ShK blockierte die Ströme durch die Kv1.3 Kanäle mit einem IC_{50} von 16 pM während in Kv1.2 und Kv1.5 Kanälen der IC_{50} >1 μ M war (Kalman et al., 1998). Somit werden die Kv1.3 Kanäle durch ShK >60000-mal besser blockiert als die Kv1.2 bzw. Kv1.5 Kanäle.

Die Ströme durch die Kv1.3 Kanäle wurden auch von Nicht-Peptid-Inhibitoren wie Piperidine (z.B. UK-78282 siehe Hanson et al., 1999), Psoralene (z.B. Psora-4 siehe Vennekamp et al., 2004; PAP-1 siehe Schmitz et al., 2005) oder Phenylalkylaminen (z.B. Verapamil siehe Chandy et al., 1984) blockiert. In der hier vorliegenden Arbeit wurde Verapamil verwendet, welches eigentlich als Ca^{2+} Kanal Blocker bekannt ist. Jedoch kann Verapamil auch Ströme durch Kv1.3 Kanäle blockieren (Chandy et al., 1984). Frühere Messungen haben gezeigt, dass

Verapamil den offenen und inaktivierten Zustand blockieren kann, jedoch nicht den geschlossenen Zustand (DeCoursey, 1995; Rauer et al., 1996; Röbe et al., 2000). Die Studien zur Bestimmung der Bindungsstelle für Verapamil an Kv1.3 Kanälen zeigten, dass intrazellulär appliziertes TEA⁺ (Tetraethylammonium) mit Verapamil um dieselbe Bindungsstelle konkurrierte und unterstützten so die Hypothese von einer intrazellulären Bindungsstelle für Verapamil (Rauer et al., 1996). Weitere Studien zeigten, dass die Bindungsstelle des Verapamils im inneren Vestibül liegt, unterhalb des Selektivitätsfilters (Rauer et al., 1999; Dreker et al., 2005). In der hier vorliegenden Studie soll zum einen der Einfluss der intra- und extrazellulären K⁺ und Rb⁺ auf die Verapamil-Affinität untersucht werden, da die Kationen einen Einfluss auf die Struktur nehmen könnten (siehe 1.4), und zum anderen soll die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion untersucht werden (siehe 1.5).

1.4 Strukturelle Veränderung verursacht durch Kationen

Unter physiologischen Bedingungen ist der Selektivitätsfilter mit zwei Kaliumionen besetzt (Zhou et al., 2003) und auch der wassergefüllte Bereich (inneres Vestibül) ist mit einem Kaliumion besetzt (Abb. 2A; Zhou et al., 2004). Veränderungen in der Besetzung der Kationen-Bindungsstelle im Selektivitätsfilter und eine damit einhergehende Strukturänderung (siehe unten) könnten einen Einfluss auf die Verapamil-Affinität nehmen, da das Verapamil direkt unterhalb des Selektivitätsfilters bindet (Rauer et al., 1999; Dreker et al., 2005).

Der Selektivitätsfilter besitzt, wie schon erwähnt, in hoher K⁺ Konzentration vier Bindungsstellen für Ionen (Abb. 4A; Zhou et al., 2003). In hoher Rb⁺ Konzentration existieren nur noch drei anstelle von vier Bindungsstellen im Selektivitätsfilter (Abb. 4B; Zhou et al., 2003). Aber ansonsten ist die Struktur des Selektivitätsfilters in hoher Rb⁺ Konzentration ähnlich zur Struktur unter hohen K⁺ Bedingungen. Somit kommt es zu keinen großen Strukturveränderungen zwischen hohem K⁺ und hohem Rb⁺. Ferner zeigten Zhou und Kollegen (2003), dass bei geringen Konzentrationen an K⁺ das Rückgrat der Carbonylgruppe von V76 im KcsA Kanal vom Zentrum wegdreht, das C^α von G77 der Pore gegenübersteht und dass die Ionen an den Positionen 2 und 3 fehlen (Abb. 4C). Somit ist in geringen K⁺ Konzentrationen der Selektivitätsfilter gering besetzt und es kommt zu einer

signifikanten Veränderung des Selektivitätsfilters. Die strukturellen Veränderungen könnten sich auf die Verapamil-Affinität auswirken.

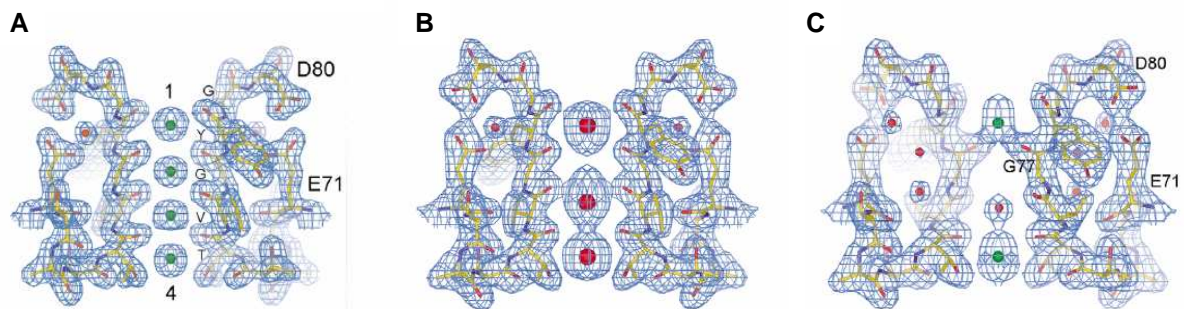


Abbildung 4: Ionen-Bindungsstellen im Selektivitätsfilter vom KcsA Kanal, dargestellt als Elektronen-Dichte-Abbildungen (Zhou et al., 2003). Zur einfachen Darstellung sind nur zwei Untereinheiten gezeigt. (A) Der Selektivitätsfilter unter hohen K^+ Bedingungen (200 mM). Die vier Bindungsstellen für K^+ sind als grüne Kreise gezeigt, von der extrazellulären (1) zur intrazellulären (4) Seite. (B) Der Selektivitätsfilter unter hohen Rb^+ Bedingungen (200 mM). Die Bindungsstellen für Rb^+ sind als rote Kreise gezeigt. Die Struktur ist ähnlich zu A, jedoch mit dem Unterschied, dass es nur drei anstelle von vier Bindungsstellen gibt. (C) Der Selektivitätsfilter unter niedrigen K^+ Bedingungen (3 mM), führt zu signifikanten Veränderungen in der Struktur. Die Bindungsstellen an Positionen 2 und 3 fallen weg. (Quelle: Zhou et al., 2003)

1.5 Spannungsabhängigkeit der Verapamil Hin- und Rückreaktion

Eine interessante Beobachtung in Kv1.3 Kanälen war die schwache Spannungsabhängigkeit der Verapamil Blockade (Hinreaktion) bei positiven Potentialen und der starken Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion (off-rate) bei Potentialen die negativer sind als -60 mV (Röbe et al., 2000).

Verapamil blockiert nur den offenen bzw. inaktivierten Zustand (DeCoursey, 1995; Rauer et al., 1996; Röbe et al., 2000). Während der Kanal sich im geschlossenen Zustand befindet, kann er auch von sehr hohen Konzentrationen an Verapamil (100 μ M) nicht blockiert werden (DeCoursey, 1995). Aber bei Potentialen, die die Kanäle in einen aktivierten, offenen Zustand bringen, wurden die Ströme durch die Kv1.3 Kanäle bei beispielsweise 100 μ M Verapamil annähernd komplett blockiert (DeCoursey, 1995). Dabei spielte die Größe der eingesetzten Spannung eine untergeordnete Rolle. Bei einem Potential von 0 mV sind annähernd alle Kanäle im offenen Zustand und die Ströme durch die Kanäle werden fast genauso gut

reduziert wie vergleichsweise bei einem Potential von +100 mV. Die Verapamil-Hinreaktion besitzt somit nur eine schwache Spannungsabhängigkeit (138 mV / e-fach; DeCoursey, 1995). Der entscheidende Faktor in der Blockade der Ströme durch die Kanäle ist der Zustand, in dem sich die Kanäle befinden. Die Kv1.3 Kanäle müssen von dem geschlossenen in den offenen Zustand übergehen (siehe 1.1.2), damit sie von Verapamil blockiert werden können. Folglich überwiegt eine Zustandabhängigkeit der Verapamil-Hinreaktion jeglicher Spannungsabhängigkeit. Im Gegensatz dazu wurde für die Rückreaktion von Verapamil eine Spannungsabhängigkeit postuliert (Röbe et al., 2000), denn je negativer die Spannung war desto schneller konnte Verapamil seine Bindungsstelle verlassen und zwar mit einer Spannungsabhängigkeit von -36 mV / e-fach (Röbe et al., 2000). Die Autoren schlossen daraus, dass die starke Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion durch das positiv geladene Verapamil entstanden sein könnte, da Verapamil das elektrische Feld der Membran zu spüren bekommt und aufgrund der negativen Ladung seine Bindungsstelle verlässt. Jedoch könnte die starke Spannungsabhängigkeit bei negativen Potentialen durch einen spannungsabhängigen Eintritt von K^+ in den Kanal verursacht sein oder durch den Schließvorgang des Kanals selbst zustande kommen und nicht durch die Spannung, welches das Verapamil wahrnimmt.

2. Zielsetzung

Über die Blockade von spannungsabhängigen Kv1.3 Kanälen durch Verapamil ist bekannt, dass die Verapamil-Hinreaktion eine Zustandsabhängigkeit aufweist, d.h. Verapamil kann nur den offenen und den inaktivierten Zustand blockieren, nicht aber den geschlossenen Zustand (DeCoursey, 1995; Rauer et al., 1996; Röbe et al., 2000). Außerdem konnte schon gezeigt werden, dass die Bindungsstelle von Verapamil unterhalb des Selektivitätsfilters liegt (Rauer et al., 1999; Dreker et al., 2005). Veränderungen im Bereich des Selektivitätsfilters könnten demnach zu Veränderungen in der Verapamil-Affinität führen. Da die Struktur im Bereich des Selektivitätsfilters durch Besetzung verschiedener Kationen verändert wird (Zhou et al., 2003), könnte sich auch die Verapamil-Affinität durch verschiedene Kationen verändern. Dies könnte sowohl die Hin- als auch die stark spannungsabhängige Rückreaktion von Verapamil beeinflussen.

In dieser Arbeit sollen zwei Fragen-Komplexe beantwortet werden:

1. Der Einfluss von Kationen auf die Wirkung von Verapamil:
 - a) Welchen Einfluss hat die intrazelluläre Kationenkonzentration auf die Verapamil-Affinität?
 - b) Wie verändert sich die Verapamil-Affinität unter Einfluss von Rb^+ verglichen zu K^+ ?
 - c) Gibt es Unterschiede zwischen den inaktivierenden Wildtyp *hKv1.3* Kanälen und den nicht-inaktivierenden mutierten H399T Kanälen?
2. Die Ursache der Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion:
 - a) Könnte die Spannungsabhängigkeit auf das positiv geladene Verapamil zurückzuführen sein?
 - b) Könnte die Spannungsabhängigkeit von einem spannungsabhängigen Eintritt von K^+ verursacht sein?
 - c) Könnte die spannungsabhängige Schließung der Kanäle für die Verapamil-Rückreaktion verantwortlich sein?

3. Material und Methoden

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Lösungen und Reagenzien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland), Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA) und Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

LB-Medium (10 g/l NaCl, 10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt; ad pH 7,0 mit 5 M NaOH) wurde als bakterielle Flüssigkultur verwendet. Zur Herstellung fester Nährböden (LB Agarplatten) wurde die Flüssigkultur mit 20 g/l Agar versetzt. Direkt nach der Herstellung erfolgte die Sterilisierung der Medien mittels eines Autoklaven. Dabei wurden die Medien einer Temperatur von 120 °C und einem Druck von 1,2 bar über 20 min ausgesetzt. Für selektives Wachstum wurden die Medien nach der Sterilisation, bei einer Temperatur von circa 60 °C, mit Antibiotika, wie z.B. Ampicillin versetzt. Die Endkonzentration von Ampicillin betrug dabei 100 mg/l (LB^{+Amp} Medien). Die dazu verwendete, sterilfiltrierte Stocklösung enthielt 100 g/l Ampicillin-Na in einer 50 % (v/v) Ethanol/H₂O Lösung und wurde bei -20 °C aufbewahrt. Als Vollmedium für die Transformation diente 2YT Medium (5 g/l NaCl, 16 g/l Pepton, 10 g/l Hefeextrakt; ad pH 7,0 mit 5 M NaOH).

3.1.2 DNA-Klone

Das *hKv1.3* Wildtyp Plasmid wurde mir freundlicherweise von Prof. Dr. O. Pongs (Institut für Neurale Signalverarbeitung, Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg, Deutschland) und das Plasmid für den mutierten Kanal H399T von Dr. T. Dreker (4SC AG, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. In den pRc/CMV Vektor (5542bp; Invitrogen Corp., Carlsbad CA, USA) ist das vollständige humane Kv1.3 Kaliumkanal-Gen (1841bp) bzw. das Gen mit der Mutation eingebaut. Der Vektor enthält einen CMV Promotor für die Proteinexpression des klonierten *hKv1.3* Gens bzw. H399T Gens in

Säugetierzellen und ein Gen für die Ampicillin-Resistenz zur selektiven Proliferation.

3.1.3 Transformation

Bei der Transformation wurde die Plasmid-DNA in *E. coli* Zellen eingeschleust. In diesem Fall wurde der *E. coli* Stamm XL10-Gold (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verwendet. Dabei wurden 50 µl der kompetenten *E. coli* Zellen (Zelldichte = $\sim 1 \cdot 10^8$ / ml), die bei -80°C gelagert werden, auf Eis aufgetaut und anschließend mit etwa 10 ng Plasmid-DNA vermischt. Das Gemisch wurde zunächst 30 Minuten auf Eis inkubiert, um es dann einem Hitzeschock auszusetzen (60 s bei 42°C). Danach erfolgte mit den transformierten Bakterien abermals eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde dem Ansatz 500 µl 2YT Medium zugegeben. Der komplette Ansatz mit den Bakterien und den Medien wurde für eine Stunde bei 37°C bei 300-500 U_pM inkubiert, um ein Wachstum der Bakterien zu gewährleisten. Anschließend wurde 300 µl des Ansatzes auf selektiven LB^{+Amp} Agarplatten ausplattiert und über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. In diesem Fall wuchsen nur die Bakterien mit einer Ampicillin-Resistenz.

3.1.4 Isolierung der Plasmid-DNA

Ausreichende Mengen an Plasmid-DNA wurden mittels des GFXTM Micro Plasmid Prep Kits (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) gewonnen, nach der Vorschrift des Herstellers. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde in einem Photometer (GeneQuant 1300, GE Healthcare, München, Deutschland) durch die Absorption von Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Lösungen und Reagenzien

Die COS-7 Zellen (aus dem Nierengewebe von afrikanischen Grünen Meerkatzen) wurden kultiviert in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) mit einem hohen Glucoseanteil (Invitrogen, Kat.-Nr.: 41966) und mit einem Anteil von 10 % fötalem

Kälberserum (FBS; PAA Laboratories GmbH, Cat.-No.: A15-041). Für den Waschvorgang der adhären Zellen, der dem Entfernen von toten Zellen und Serumrückständen diene, wurde Mg²⁺- und Ca²⁺-freies PBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) verwendet. Eine 0,05 % Trypsin-EDTA Lösung (Invitrogen Ltd., Paisley, Scotland, UK, Kat.-Nr. 25300) diene zum Ablösen der Zellen vom Substrat der Kulturflaschen.

3.2.2 Kultivierung der COS-7 Zelllinie

Die COS-7 Zelllinie wurde von der *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ, Braunschweig, Nr.: ACC 60) erworben. Die Zellen wurden aufbewahrt in einem luftbefeuchteten Inkubator bei 37°C mit 5 % bzw. 10 % CO₂. Alle 3-4 Tage erfolgte unter sterilen Bedingungen ein Splitten der Zellen in einem Verhältnis von 1:10 oder 1:5.

3.2.3 Transfektion mit Plasmid-DNA

Die Transfektion von COS-7 Zellen erfolgte mit Hilfe des Fugene 6 Transfektionsreagenz der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland). Die Zellen wurden sowohl mit der *hKv1.3* Plasmid-DNA bzw. H399T Plasmid-DNA als auch mit einem, für das green fluorescent protein (GFP) kodierenden Vektor transfiziert (eGFP-N1 Plasmid-DNA, Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, USA). Das GFP diene zur späteren Identifizierung der transfizierten Zellen. Für die Transfektion wurden am Vortag oder ca. 6 Stunden vor der eigentlichen Transfektion bei dem Splittvorgang etwa 500 µl der Zellen in 35 mm Schälchen überführt und mit 1,5 ml Medium aufgefüllt. Die Transfektion erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers mit einer Ausnahme: Den Zellen wurde das Medium abgesaugt, das Fugene-DNA-Gemisch wurde auf die Zellen gegeben und nach einer 2-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde etwa 1,5 ml frisches Medium hinzugefügt. Ein Tag nach der Transfektion hatten die Zellen ausreichend Proteine für den *hKv1.3* Kanal bzw. H399T Kanal und das GFP exprimiert und die transfizierten Zellen konnten für die elektrophysiologischen Messungen verwendet werden.

3.3 Elektrophysiologie

3.3.1 Lösungen und Reagenzien

Die Zusammensetzung der extrazellulären Badlösung und der intrazellulären Pipettenlösung ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

in mM			EGTA	CaCl ₂	MgCl ₂	HEPES
[Na ⁺] _e	160 KCl	4,5 KCl		2	1	5
[K ⁺] _e	164,5 KCl			2	1	5
[Rb ⁺] _e	164,5 RbCl			2	1	5
Hohes [K ⁺] _i	145 KF		10		2	10
Niedrig [K ⁺] _i	10 KF	135 TMAF	10		2	10
Hohes [Rb ⁺] _i	145 RbF		10		2	10
Niedrig [Rb ⁺] _i	10 RbF	135 TMAF	10		2	10

Tabelle 1: Zusammensetzung der extrazellulären Badlösung (e) und der intrazellulären Pipettenlösung (i). Der pH-Wert wurde mit XOH (X = Na⁺, K⁺, Rb⁺) auf 7,4 in der extrazellulären und auf 7,2 in der intrazellulären Lösung eingestellt.

Die Osmolarität der extrazellulären sowie der intrazellulären Lösungen betrug 290 – 320 mOsm.

Das Phenylalkylamin Verapamil wurde als (±)-Verapamil von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) bezogen. Verapamil wurde als Stocklösung in DMSO gelöst und bei +4°C im Dunkeln gelagert. Zur Applikation wurden die Stocklösungen in der extrazellulären Badlösung auf die jeweilige Endkonzentration verdünnt, wobei der DMSO Anteil in der extrazellulären Badlösung maximal 0,3 % betrug.

3.3.2 Vorbereitung der Zellen

Die COS-7 Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion gemessen. Dazu wurden die transfizierten Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA von den Schälchen abgelöst und mit etwa 1,5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Danach wurde etwa 500 µl der Zellsuspension auf spezielle Objektträger übertragen, deren Glasoberfläche für eine bessere

Adhäsion der Zellen vorher mit Poly-L-Lysinlösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) behandelt wurde. Nach einer etwa 30-minütigen Inkubation bei 37°C und 5 % bzw. 10 % CO₂ waren genug Zellen für die elektrophysiologischen Messungen an die Objektträger angehaftet.

Die speziellen Objektträger, die aus einem handelsüblichen Deckglas (24 x 24 mm, Stärke = 0,13 – 0,16 mm, VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland) für die Mikroskopie bestanden, waren mit einem Teflonring mit Hilfe eines Silikonelastomers (SYLGARD 186, Dow Corning, Inc., Midland, USA) fixiert. Dieser Teflonring diente zur Aufnahme der Badlösung und Begrenzung der Badkammer.

3.3.3 Aufbau der Patch-Clamp-Apparatur

Für die elektrophysiologischen Versuche mit der patch-clamp Methode bestand der Messplatz aus einem inversen Mikroskop, dem Axiovert 25 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland), welches zur Vibrationsdämpfung auf einem pressluftgefederten Tisch (Newport Corporation, Irvine, USA) installiert war. Die Identifizierung der mit GFP-kotransfizierten Zellen erfolgte mit der Fluoreszenzeinheit des Mikroskops. Darüber hinaus war zur Induktion und Aufnahme von Ganzzellströmen ein EPC-9 Patch-Clamp-Verstärker (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht, Deutschland) notwendig. Der Verstärker war mit einem Dell Computer verbunden und wurde mit Hilfe der Software Patchmaster v2.00 (HEKA Elektronik GmbH) bedient, die außerdem zur Aufnahme und Speicherung der Messdaten diente.

3.3.4 Versuchsdurchführung

Die verwendeten Elektroden für die Versuche bestanden jeweils aus einem chlorierten Silberdraht, der entweder über eine Agarbrücke mit der Badlösung verbunden war (Badelektrode) oder sich in einer Glaskapillare, umgeben von Pipettenlösung (Messelektrode) befand. Die Glaskapillaren (GB150-TF10) wurden von der Science Products GmbH (Hofheim, Deutschland) bezogen und mit einem Zeitz DMZ Universal Puller (Zeitz - Instruments Vertriebs GmbH, München, Deutschland) in drei Stufen gezogen und anschließend feuerpoliert. Der Pipettenwiderstand befand sich dabei immer im Bereich von 2 - 4 MΩ.

Die Messungen erfolgten in den Konfigurationen whole-cell oder outside-out der Patch-Clamp-Technik (Hamill et al., 1981) und wurden ausschließlich bei Raumtemperatur (18-22°C) durchgeführt. Alle Ströme wurden durch einen 2,9 kHz Bessel Filter gefiltert und in einer Frequenzrate von 2 – 4 kHz aufgezeichnet. Kapazitive- und Leck-Ströme wurden subtrahiert und eine Serienwiderstandskompensation von 70 – 80 % für Ströme von > 2 nA in der whole-cell Konfiguration sowie in allen Strömen in der outside-out Konfiguration durchgeführt. Das Haltepotential V_m betrug bei allen Messungen -120 mV.

3.3.5 Auswertung der Daten

Die anschließende Analyse der Daten erfolgte mit den Softwareprogrammen Fitmaster v2.15 (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht, Deutschland), Igor Pro 3.1.2 (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, Oregon, USA) und Microsoft® Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, Seattle, USA).

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben.

3.3.5.1 Dosis-Wirkungskurve

Die Bestimmung der IC_{50} erfolgte durch das Anpassen einer modifizierten Hill Funktion (Gleichung 1) an die Werte in der Dosis-Wirkungskurve.

$$\frac{I_{verapamil}}{I_0} = \frac{1}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{C_{verapamil}} \right)^n} \quad (1)$$

$I_{verapamil}$ bezeichnet den Strom (Spitzenstrom im Wildtyp *hKv1.3* Kanal bzw. Gleichgewichtsstrom im mutierten Kanal H399T) während und I_0 den Strom vor der Applikation von Verapamil, $C_{verapamil}$ beschreibt die Konzentration von Verapamil in der extrazellulären Badlösung und n den Hill-Koeffizient. In dieser Arbeit wurde immer der IC_{50} bei einem Hill-Koeffizienten von 1 bestimmt.

3.3.5.2 Simulation der Tailströme

Abbildung 5 beschreibt die Übergänge zwischen den einzelnen Kanalzuständen (DeCoursey, 1995; Röbe, 2000). Der Kanal ist beim Haltepotential ($V_m = -120$ mV) zunächst im geschlossenen Zustand (C). Bei depolarisierenden Potentialen (z.B. +40 mV) wird der Kanal aktiviert und geht in den offenen leitenden Zustand über (C \rightarrow O). Im Wildtyp *hKv1.3* Kanal geht der Kanal bei längeren depolarisierenden Pulsen (z.B. 200 ms) von dem offenen Zustand in den C-Typ inaktivierten, nicht-leitenden Zustand (O \rightarrow I). Im Falle des Verapamils kann der offene (OB) und der inaktivierte (IB) Zustand blockiert werden (DeCoursey, 1995; Röbe, 2000).

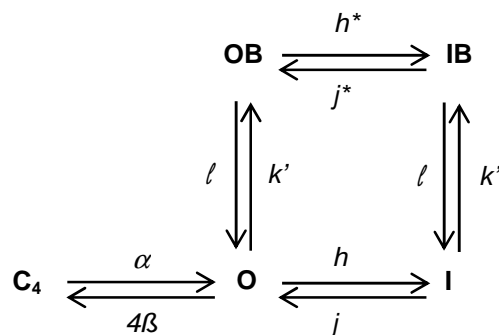


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Übergänge zwischen den einzelnen Kanalzuständen des *hKv1.3* ohne und mit Verapamil. C_4 beschreibt den letzten geschlossenen Zustand nach der Hodgkin-Huxley-Kinetik, O steht für den offenen, leitenden und I für den C-typ inaktivierten Zustand. In Anwesenheit von Verapamil ist das Diagramm um zwei blockierte Zustände, OB für offen-blockiert und IB für inaktiviert-blockiert, erweitert.

Mit dem Computerprogramm Microsoft® Office Excel 2003 wurde der Stromverlauf während der Hyperpolarisation des *hKv1.3* Kanals anhand der vereinfachten folgenden Differentialgleichung (Röbe, 2000) simuliert.

$$dO / dt = - 4\beta * O - k' * O + l * OB \quad (2)$$

wobei 4β den Übergang vom offenen (O) zum geschlossenen (C) Zustand, k' den Übergang von O in den offen-blockierten (OB) und l von OB zu O beschreibt. Alle Ratenkonstanten werden in 1/s angegeben. Von k' ausgehend konnte ich k als $k = k' / [\text{verapamil}]$ ableiten. Für die Simulation während der Hyperpolarisation habe ich eine Spannungsabhängigkeit für k von 138 mV / e-fach angenommen, die von DeCoursey (1995) für *hKv1.3* bestimmt worden war.

4. Ergebnisse

Verapamil blockiert den *hKv1.3* Kanal im offenen und inaktivierten Zustand, jedoch nicht im geschlossenen Zustand (DeCoursey, 1995; Rauer et al., 1996; Röbe et al., 2000; siehe Abb. 5). Weitere Studien zeigten, dass die Bindungsstelle des Verapamils im inneren Vestibül, unterhalb des Selektivitätsfilters, liegt (Rauer et al., 1999; Dreker et al., 2005). Somit könnte der Effekt von Verapamil auf den Kanal durch die Besetzung des Selektivitätsfilters und damit durch intrazelluläre und extrazelluläre Kationen beeinflusst werden, denn es ist bekannt, dass die Konzentration an Kaliumionen die Besetzung des Selektivitätsfilters beeinflusst und damit gleichzeitig die Proteinstruktur im Bereich des Selektivitätsfilter verändern kann (Zhou *et al.*, 2003), was zu Veränderungen in der Verapamil-Affinität führen könnte. In dieser Arbeit soll der Einfluss intra- und extrazellulärer Kationen auf die Verapamil-Affinität im *Kv1.3* Kanal untersucht werden. Für diese Untersuchungen wurden der *hKv1.3* Wildtyp Kanal und der mutierte Kanal H399T verwendet. Der H399T Kanal zeichnet sich durch eine starke Verkürzung des C-Typ inaktivierten Zustandes aus (Rauer et al., 1996; Dreker et al., 2005).

4.1 Auswirkungen von intrazellulärem K^+ und Rb^+ auf die Verapamil-Affinität im Wildtyp *hKv1.3* Kanal und im mutierten Kanal H399T

Da Verapamil auf der intrazellulären Seite des Kanals in der Nähe des Selektivitätsfilters agiert, könnten die intrazellulären Kationen die Affinität des Verapamils beeinflussen. Aufgrund dessen wurden in der whole-cell Konfiguration verschiedene intrazelluläre Kationen in jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen auf ihren Einfluss auf die Verapamilblockade im Kanal getestet.

4.1.1 Wildtyp *hKv1.3*

Die Versuche erfolgten zunächst unter physiologischen Bedingungen, d.h. in hohem $[Na^+]_e$ und mit 145 mM $[K^+]_i$ im Wildtyp Kanal in Ab- und Anwesenheit von Verapamil (Abb. 6A). Der Strom wurde zunächst in Abwesenheit von Verapamil ausgelöst, indem das Membranpotential von -120 mV auf +40 mV für 200 ms und

zurück auf -120 mV verändert wurde. Während der Depolarisation gehen die Kanäle zunächst innerhalb weniger Millisekunden auf (C → O; siehe Abb. 6A) und anschließend in den C-Typ inaktivierten Zustand über (O → I; Abb. 6A), d.h. die Kanäle inaktivieren. Die Zeitkonstante für diese Inaktivierung (τ_h) beträgt bei +40 mV 276 ± 103 ms (n = 3). Dieser Wert stimmt mit der Literatur überein (291 ms; Dreker et al., 2005).

Um die Verapamilblockade zu charakterisieren, wurde im Wildtyp *hKv1.3* Kanal die Abnahme des Spitzenstromes nach Verapamilapplikation herangezogen. Nach der Zugabe von Verapamil dauerte es etwa fünf Minuten bis der Spitzenstrom ein Gleichgewicht erreichte („use-dependent block“; Nguyen et al., 1996; Hille, 2001). In Abbildung 6A sind nur die Ströme gezeigt nach dem Erreichen dieses Gleichgewichts des Spitzenstromes.

Wie man anhand der Abbildung 6A erkennen kann, wird der Strom durch den *hKv1.3* Wildtyp Kanal in Anwesenheit von Verapamil kleiner. Durch die Applikation von beispielsweise 3 μ M Verapamil wurden etwa 53 % des Spitzenstromes, verglichen zu dem Kontrollstrom ohne Verapamil, blockiert. Mittels der verschiedenen Konzentrationen von Verapamil und die dadurch entstandene Reduzierung des Spitzenstromes konnte eine Dosis-Wirkungskurve zur Bestimmung des IC_{50} erstellt werden. Dabei wurde in 145 mM $[K^+]_i$ ein IC_{50} von 2,6 μ M ermittelt (Abb. 6B). Dieses Ergebnis stimmte mit den Angaben in der Literatur überein (Dreker et al., 2005).

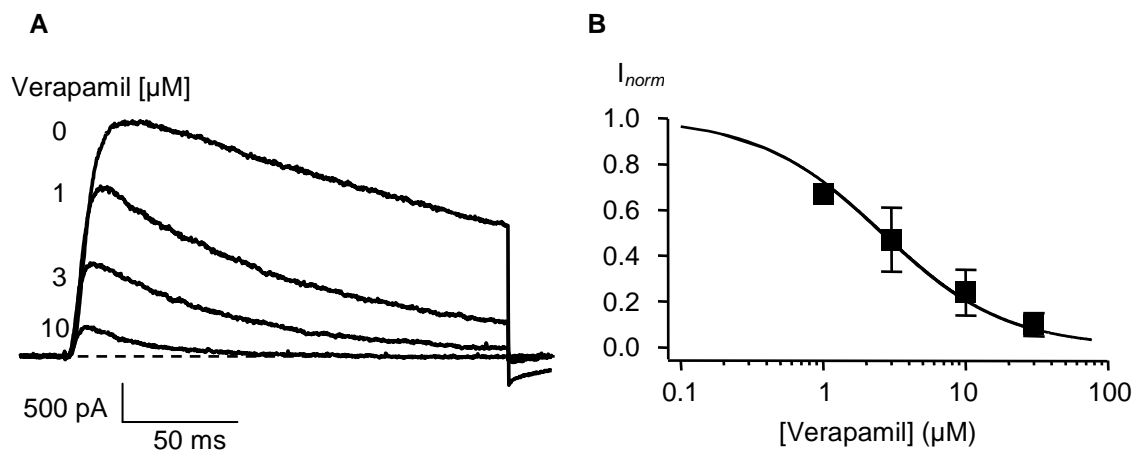


Abbildung 6: Inhibition der Ströme durch *hKv1.3* Wildtyp Kanäle durch Verapamil bei 145 mM $[K^+]_i$. (A) Die Ströme wurden in der whole-cell Konfiguration induziert, indem vom Haltepotential -120 mV durch depolarisierende 200 ms Spannungspulse auf +40 mV im Intervall von 30 s. Die Applikation von Verapamil erfolgte über die extrazelluläre Badlösung. Die Ströme in Anwesenheit von Verapamil sind gezeigt nach dem 10. Puls nach Lösungswechsel und dem Erreichen eines Gleichgewichts (use-dependent block). (B) Dosis-Wirkungskurve von Verapamil, Ströme durch *hKv1.3* Kanäle zu reduzieren. Die Datenpunkte wurden aus den normalisierten Spitzenströmen nach Verapamilapplikation bei verschiedenen Konzentrationen gewonnen und die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung sind dargestellt (Standardabweichungen sind nur dann gezeigt, wenn sie die Symbolgröße überschreiten). Die durchgezogene Linie stellt das Anpassen einer modifizierten Hill Funktion (siehe 3.3.5.1) an die Datenpunkte dar und zeigt einen IC_{50} von 2,6 μ M.

Zur Untersuchung der Verapamil-Affinität in Bezug auf die intrazellulären Kationen wurde $[K^+]_i$ von 145 mM auf 10 mM reduziert (Abb. 7A). Das erste was durch eine niedrige intrazelluläre K^+ Konzentration auffällt, ist der beschleunigte Übergang vom offenen in den C-Typ inaktivierten Zustand, was evtl. auch die Verapamil-Affinität beeinflussen könnte. Der Übergang in die C-Typ Inaktivierung bei +40 mV beträgt in 10 mM $[K^+]_i$ 132 ± 50 ms ($n = 6$) und ist somit etwa 2-mal schneller als in 145 mM $[K^+]_i$ (276 ms).

Der Spitzenstrom durch den Wildtyp Kanal in 10 mM $[K^+]_i$ wurde durch die Zugabe von 3 μ M Verapamil um etwa 22 % reduziert. Diese Reduktion des Spitzenstromes war wesentlich weniger als in hohem $[K^+]_i$ (~53 %, vgl. Abb. 6A). Anhand der blockierten Spitzenströme, nach der Zugabe von verschiedenen Verapamil Konzentrationen, konnte eine Dosis-Wirkungskurve erstellt werden (Abb. 7B), mit einem IC_{50} von 9,1 μ M (Abb. 7B). Die Abnahme der intrazellulären K^+ Konzentration reduzierte also die Verapamil-Affinität um einen Faktor von 3,5.

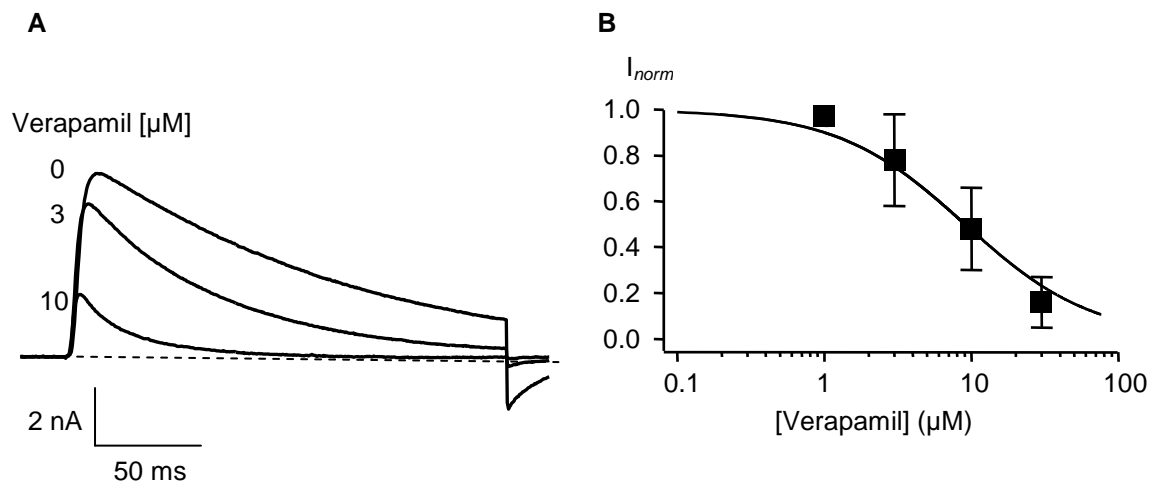


Abbildung 7: Inhibition der Ströme durch *hKv1.3* Wildtyp Kanäle durch Verapamil bei 10 mM $[K^+]_i$. (A) Die Ströme wurden aufgezeichnet wie für Abbildung 6 beschrieben. (B) Dosis-Wirkungskurve von Verapamil, Ströme durch *hKv1.3* Kanäle zu reduzieren. Datenpunkte wurden erhalten wie für Abbildung 6B beschrieben und stellen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung dar (Standardabweichungen sind nur dann gezeigt, wenn sie die Symbolgröße überschreiten). Die durchgezogene Linie stellt das Anpassen einer modifizierten Hill Funktion (siehe 3.3.5.1) an die Datenpunkte dar und zeigt einen IC_{50} von 9,1 μ M.

Die ersten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Bindung des Verapamils durch eine geringere Konzentration an intrazellulärem K^+ reduziert wird. Dies könnte zum einen auf die schnellere Inaktivierung (Faktor 2) durch 10 mM $[K^+]_i$ zurückzuführen sein und zum anderen auch auf das Kation selbst. Um zu beobachten, ob dieser Effekt auch mit einem anderen Kation wiederholt werden kann, wurde ein analoges Kation zu K^+ verwendet, das Rb^+ .

Im Falle von intrazellulärem Rb^+ war ein ähnlicher Effekt auf die Verapamil-Bindung wie bei K^+ zu beobachten. Zunächst fällt jedoch auf, dass der Übergang in die C-Typ Inaktivierung sich durch hohes $[Rb^+]_i$ verändert (Abb. 8A). Die Zeitkonstante für die Inaktivierung bei +40 mV beträgt 727 ± 70 ms ($n = 4$), und ist somit um ein 2,6-faches langsamer als in hohem $[K^+]_i$, was sich auch auf den Effekt des Verapamils in 145 mM $[Rb^+]_i$ auswirken könnte. Durch die Zugabe von 3 μ M Verapamil verblieb ein Reststrom in 145 mM $[Rb^+]_i$ von etwa 80 % verglichen zu dem Kontrollstrom. Ein Vergleich zu 145 mM $[K^+]_i$ zeigt, dass 3 μ M Verapamil eine 1,7-fach stärkere Wirkung in $[K^+]_i$ auf den Spitzenstrom aufweist als in $[Rb^+]_i$. Anhand der Dosis-Wirkungskurve wurde ein IC_{50} von 8,3 μ M in hohem $[Rb^+]_i$ ermittelt (Abb. 8B). Die Affinität des Verapamils wurde in $[Rb^+]_i$ also um einen

Faktor 3 reduziert verglichen zu $[K^+]_i$, was in etwa dem Faktor der Veränderung in der C-Typ Inaktivierung entspricht.

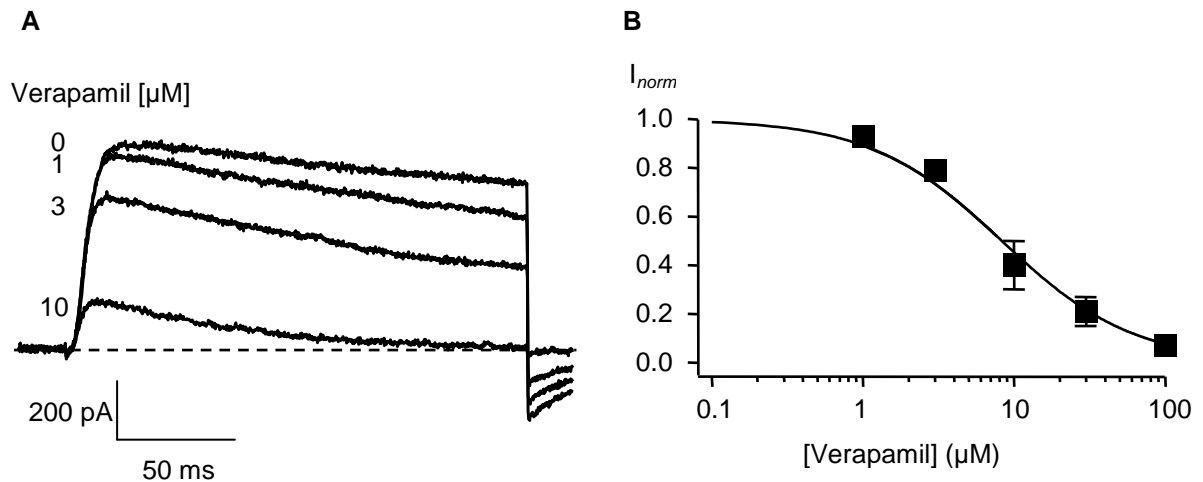


Abbildung 8: Inhibition der Ströme durch *hKv1.3* Wildtyp Kanäle durch Verapamil bei 145 mM $[Rb^+]_i$. (A) Die Ströme wurden aufgezeichnet wie für Abbildung 6 beschrieben. (B) Dosis-Wirkungskurve von Verapamil, Ströme durch *hKv1.3* Kanäle zu reduzieren. Datenpunkte wurden erhalten wie für Abbildung 6B beschrieben und stellen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung dar (Standardabweichungen sind nur dann gezeigt, wenn sie die Symbolgröße überschreiten). Die durchgezogene Linie stellt das Anpassen einer modifizierten Hill Funktion (siehe 3.3.5.1) an die Datenpunkte dar und zeigt einen IC_{50} von 8,3 μ M.

Eine Verminderung der Konzentration von 145 mM auf 10 mM $[Rb^+]_i$ (Abb. 9A) führte nicht zu so einem starken Übergang in den C-Typ inaktivierten Zustand wie es bei niedrigem $[K^+]_i$ der Fall war (Abb. 7A). In 10 mM $[Rb^+]_i$ beträgt die Zeitkonstante der Inaktivierung bei +40 mV 556 ± 171 ms ($n = 10$) und ist folglich 1,3-mal schneller als in hohem $[Rb^+]_i$, aber 4,2-mal langsamer als in 10 mM $[K^+]_i$. Der Stromverlauf in niedrigem $[Rb^+]_i$ glich ansonsten dem Verlauf in hohem $[Rb^+]_i$. In 10 mM $[Rb^+]_i$ führte die Zugabe von 10 μ M Verapamil zu einem geringen Block von ~15 % des Spitzenstromes. Sowohl in 145 mM $[Rb^+]_i$ als auch bei 10 mM $[K^+]_i$ war dagegen schon ~20 % des Spitzenstromes gegenüber dem Kontrollstrom durch 3 μ M Verapamil geblockt. Durch eine Dosis-Wirkungskurve wurde in 10 mM $[Rb^+]_i$ ein IC_{50} von 33,7 μ M (Abb. 9B) ermittelt. Die Verapamil-Affinität in niedrigem $[Rb^+]_i$ ist somit um einen Faktor von ~4, verglichen zu den IC_{50} Werten in 145 mM $[Rb^+]_i$ und 10 mM $[K^+]_i$, reduziert.

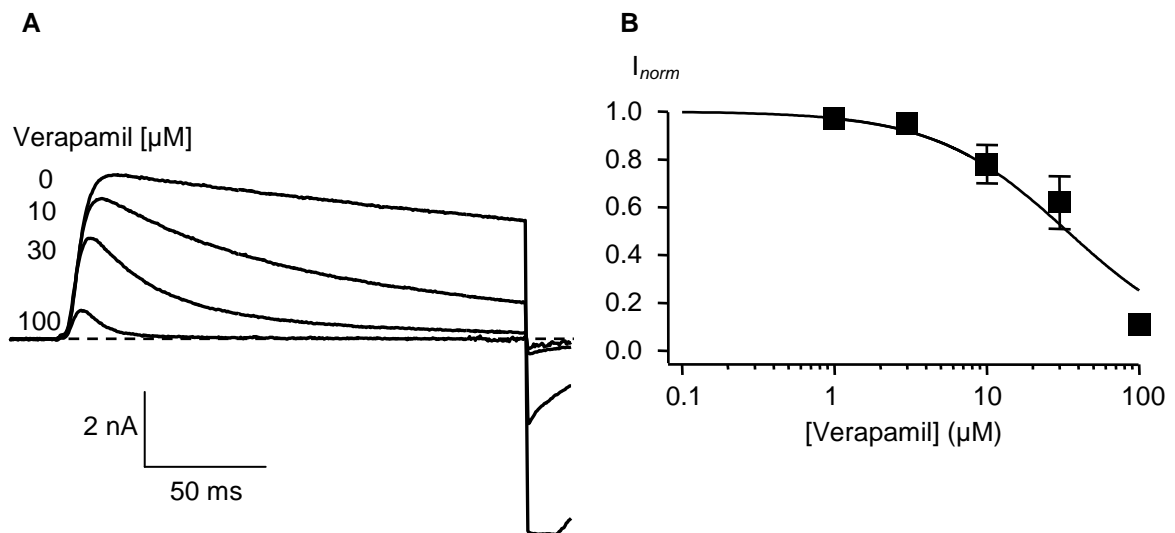


Abbildung 9: Inhibition der Ströme durch *hKv1.3* Wildtyp Kanäle durch Verapamil bei 10 mM $[Rb^+]_i$. (A) Die Ströme wurden aufgezeichnet wie für Abbildung 6 beschrieben. (B) Dosis-Wirkungskurve von Verapamil, Ströme durch *hKv1.3* Kanäle zu reduzieren. Datenpunkte wurden erhalten wie für Abbildung 6B beschrieben und stellen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung dar (Standardabweichungen sind nur dann gezeigt, wenn sie die Symbolgröße überschreiten). Die durchgezogene Linie stellt das Anpassen einer modifizierten Hill Funktion (siehe 3.3.5.1) an die Datenpunkte dar und zeigt einen IC_{50} von 33,7 μ M.

Sowohl bei $[Rb^+]_i$ als auch bei $[K^+]_i$ wurde eine verringerte Affinität des Verapamils durch eine geringere Konzentration an intrazellulären Kationen um einen Faktor von ~ 4 festgestellt, was auf einen Zusammenhang zwischen der Wirkung des Verapamils und dem intrazellulären Kation hindeutet.

Die veränderten Effekte von Verapamil sowohl in $[K^+]_i$ als auch in $[Rb^+]_i$ könnten zum einen auf den schnelleren Übergang in den C-Typ inaktivierten Zustand, besonders in 10 mM $[K^+]_i$, zurückzuführen sein und/oder zum anderen auch auf das Kation selbst. Durch die Reduktion der intrazellulären Kationenkonzentration kommt es zu einer geringeren Besetzung der Kationen-Bindungsstellen im Selektivitätsfilter, wodurch die Struktur im Bereich um den Selektivitätsfilter verändert wird. Diese strukturellen Veränderungen könnten auch zu einer Veränderung in der Verapamil-Affinität führen. Um zu überprüfen, ob die durch Kationen induzierten veränderten Verapamileffekte auf den schnelleren Übergang in den C-Typ inaktivierten Zustand zurückzuführen sind, wurden die bisher beschriebenen Experimente an mutierten H399T Kanälen unter identischen Bedingungen wiederholt.

4.1.2 H399T

In mutierten Kanälen H399T ist der C-Typ inaktivierte Zustand stark reduziert (Rauer et al., 1996; Dreker et al., 2005). Dadurch kann in H399T Kanälen ausgeschlossen werden, dass die Inaktivierung eine Rolle in der Verapamil-Affinität spielt. In mutierten Kanälen H399T führt deshalb die Zugabe von Verapamil zu einem einstellen eines Blockade-Gleichgewichts am Ende des depolarisierenden Pulses. Der IC_{50} Wert wurde deshalb nach der Zugabe von verschiedenen Verapamil Konzentrationen direkt durch die Abnahme des Gleichgewichtstromes am Ende des 200 ms depolarisierenden Pulses in H399T ermittelt (Röbe et al., 2000; Dreker et al., 2005) und nicht wie im Wildtyp Kanal durch die Abnahme des Spitzenstromes nach mehreren depolarisierenden Potentialen.

Unter Kontrollbedingungen mit 145 mM $[K^+]_i$ wurden ~85 % des Gleichgewichtstromes am Ende des depolarisierenden Pulses durch 10 μ M Verapamil inhibiert verglichen zu dem Kontrollstrom ohne die Zugabe von Verapamil (Abb. 10A). Die Affinität des Verapamils kalkuliert durch die Dosis-Wirkungskurve (Abb. 10B) entsprach einem IC_{50} von 2,1 μ M. Dieser Wert stimmt gut mit dem Wert für die Wildtyp Kanäle (2,6 μ M, vgl. Abb. 6B) überein. Dies weist darauf hin, dass in H399T Kanälen die Mutation keine Auswirkung auf die Verapamil-Affinität unter Kontrollbedingungen hat.

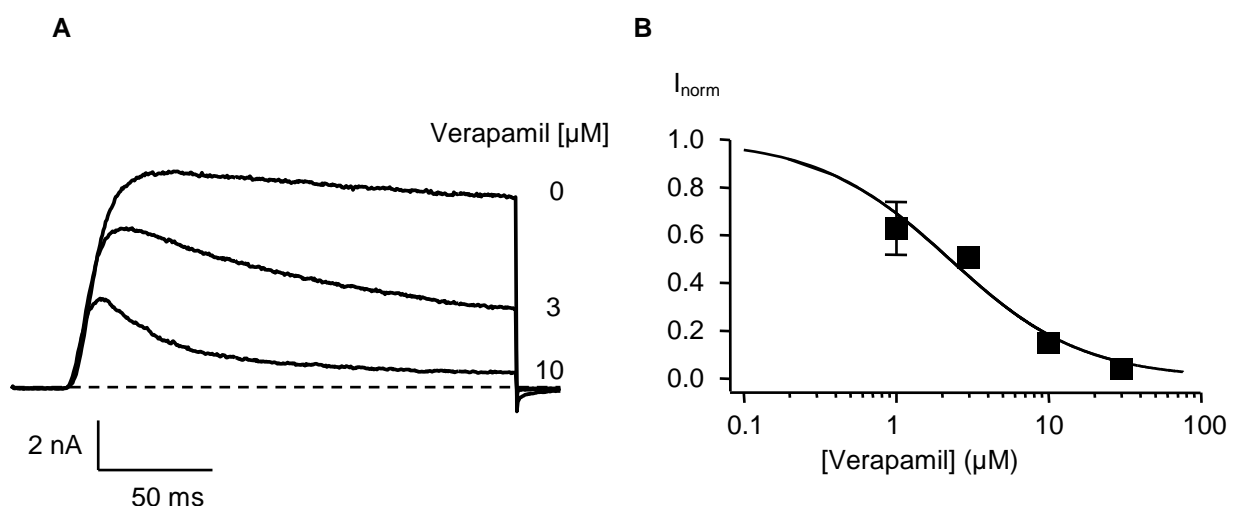


Abbildung 10: Inhibition der Ströme durch mutierte H399T Kanäle durch Verapamil bei 145 mM $[K^+]_i$. (A) Die Ströme wurden aufgezeichnet wie für Abbildung 6 beschrieben. (B) Dosis-Wirkungskurve von Verapamil, Ströme durch H399T Kanäle zu reduzieren. Die Datenpunkte

wurden aus den normalisierten Gleichgewichtsströmen (steady-state) am Ende des depolarisierenden Pulses nach Verapamilapplikation bei verschiedenen Konzentrationen gewonnen und die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung sind dargestellt (Standardabweichungen sind nur dann gezeigt, wenn sie die Symbolgröße überschreiten). Die durchgezogene Linie stellt das Anpassen einer modifizierten Hill Funktion (siehe 3.3.5.1) an die Datenpunkte dar und zeigt einen IC_{50} von 2,1 μM .

Die Reduzierung von 145 mM $[K^+]_i$ auf 10 mM $[K^+]_i$ in mutierten H399T Kanälen veränderte auch die Wirkung des Verapamils auf den Strom, der durch die Kanäle fließt. Die Applikation von beispielsweise 30 μM Verapamil führte zu einer Abnahme des Gleichgewichtsstromes („steady-state“) am Ende des depolarisierenden Pulses um fast 90 % (Abb. 11A) vom Kontrollstrom. Durch die Zugabe von verschiedenen Verapamil Konzentrationen und der daraus resultierenden steady-state Stromabnahme konnte eine Dosis-Wirkungskurve erstellt werden (Abb. 11B), die ein IC_{50} von 5,6 μM zeigt. Im Vergleich zur hohen intrazellulären K^+ Konzentration wird die Affinität des Verapamils in 10 mM $[K^+]_i$ somit um einen Faktor von ~ 3 schlechter.

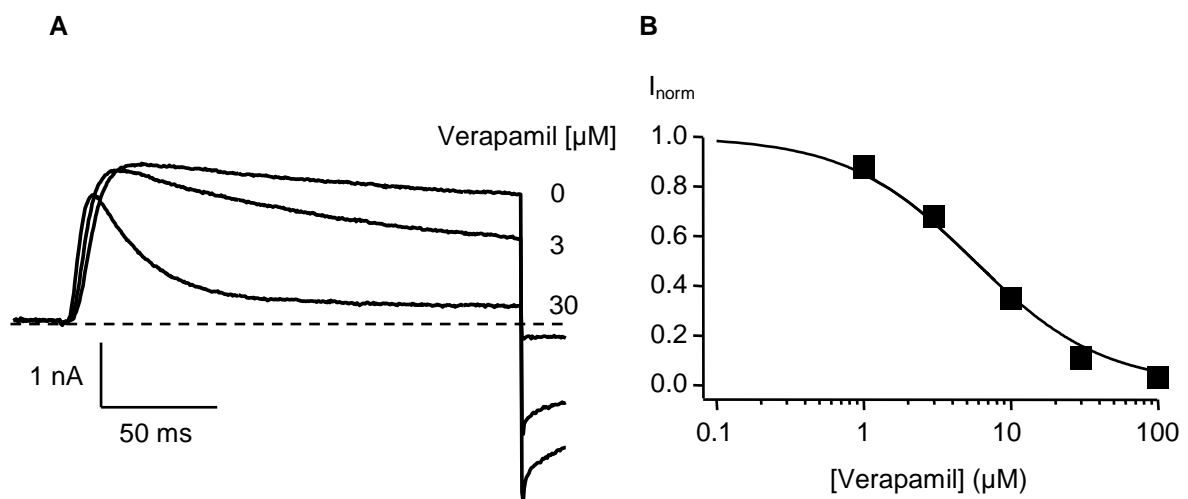


Abbildung 11: Inhibition der Ströme durch mutierte H399T Kanäle durch Verapamil bei 10 mM $[K^+]_i$. (A) Die Ströme wurden aufgezeichnet wie für Abbildung 6 beschrieben. (B) Dosis-Wirkungskurve von Verapamil, Ströme durch H399T Kanäle zu reduzieren. Datenpunkte wurden erhalten wie für Abbildung 10 beschrieben, und stellen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung dar. (Standardabweichungen sind nur dann gezeigt, wenn sie die Symbolgröße überschreiten). Die durchgezogene Linie stellt das Anpassen

einer modifizierten Hill Funktion (siehe 3.3.5.1) an die Datenpunkte dar und zeigt einen IC_{50} von $5,6 \mu\text{M}$.

In mutierten Kanälen wurde, wie auch in Wildtyp Kanälen, als weiteres Kation das Rb^+ verwendet. In $145 \text{ mM } [\text{Rb}^+]_i$ wurde durch $10 \mu\text{M}$ Verapamil $\sim 78 \%$ des Gleichgewichtstromes blockiert (Abb. 12A). Die Reduzierung der Ströme in $145 \text{ mM } [\text{Rb}^+]_i$ war vergleichbar mit der Inhibition in $145 \text{ mM } [\text{K}^+]_i$ durch $10 \mu\text{M}$ Verapamil. Mit Hilfe einer Dosis-Wirkungskurve wurde für Verapamil ein IC_{50} von $3,3 \mu\text{M}$ in $145 \text{ mM } [\text{Rb}^+]_i$ (Abb. 12B) erhalten. Der IC_{50} Wert war um einen Faktor von $\sim 1,5$ verglichen zu dem IC_{50} in hohem $[\text{K}^+]_i$ verringert. Die Verapamil-Affinität wurde in mutierten Kanälen zwischen hohen Konzentrationen an $[\text{K}^+]_i$ und $[\text{Rb}^+]_i$ nur minimal beeinträchtigt. Bei einer Verminderung der intrazellulären Rb^+ Konzentration auf 10 mM wurden durch $30 \mu\text{M}$ Verapamil etwa 90% des Gesamtstromes blockiert (Abb. 12C). Der Effekt des Verapamils in $10 \text{ mM } [\text{Rb}^+]_i$ war ähnlich wie in $10 \text{ mM } [\text{K}^+]_i$, jedoch verglichen zu $145 \text{ mM } [\text{Rb}^+]_i$ war es um das $1,5$ -fache verschlechtert. Die Verapamil-Affinität entspricht in $10 \text{ mM } [\text{Rb}^+]_i$ einem IC_{50} von $5,5 \mu\text{M}$ (Abb. 12D). Die Wirkung des Verapamils wird durch eine reduzierte $[\text{Rb}^+]_i$ Konzentration um einen Faktor von ~ 2 vermindert. Jedoch gibt es keinen Unterschied zwischen der Verapamil-Affinität in $10 \text{ mM } [\text{Rb}^+]_i$ und der Affinität in $10 \text{ mM } [\text{K}^+]_i$.

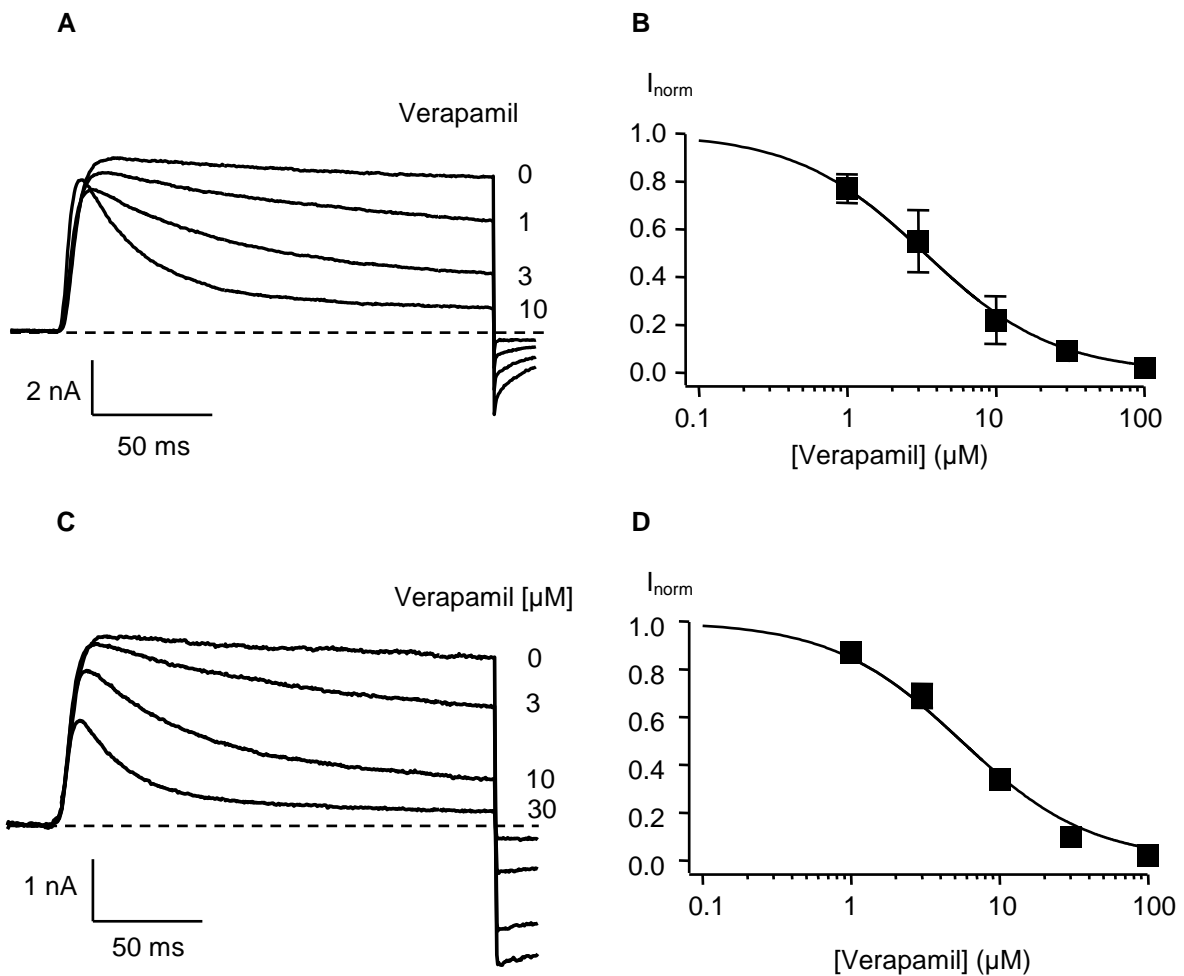


Abbildung 12: Inhibition der Ströme durch mutierte H399T Kanäle durch Verapamil in Anwesenheit von hoher (A) und niedriger (C) Konzentration an intrazellulärem Rb^+ . Die Ströme wurden aufgezeichnet wie für Abbildung 6 beschrieben. (B,D) Dosis-Wirkungskurve von Verapamil, Ströme durch H399T Kanäle zu reduzieren. Datenpunkte wurden erhalten wie für Abbildung 10 beschrieben, und stellen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung dar. (Standardabweichungen sind nur dann gezeigt, wenn sie die Symbolgröße überschreiten). Die durchgezogene Linie stellt das Anpassen einer Hill Funktion dar und zeigt einen IC_{50} von $3,3 \mu M$ in $145 mM [Rb^+]_i$ (B) und einen IC_{50} von $5,5 \mu M$ in $10 mM [Rb^+]_i$ (D).

Dem Anschein nach haben die intrazellulären Kationen nicht einen solchen Einfluss auf die Bindung des Verapamils in mutierten Kanälen wie es in Wildtyp Kanälen der Fall zu sein scheint. Da in H399T Kanälen, im Gegensatz zu den Wildtyp Kanälen, ein Effekt auf den C-Typ inaktivierten Zustand ausgeschlossen werden kann, muss die Veränderung in der Verapamil-Affinität nur auf den Einfluss der Kationen zurückzuführen sein. Eine geringe Konzentration an intrazellulären Kationen führte nämlich in den mutierten H399T Kanälen zu einer

reduzierten Affinität des Verapamils. Diese Veränderung könnte auf die geringere Besetzung der Bindungsstellen für Kationen im Selektivitätsfilter zurückzuführen sein und eine damit einhergehende Strukturveränderung.

4.1.3 Zusammenfassung von 4.1

Eine Veränderung der intrazellulären Kationenkonzentration beeinflusst den Effekt von Verapamil. In Wildtyp *hKv1.3* Kanälen haben die Kationen nicht nur einen Einfluss auf die Verapamil-Affinität (Tab. 2), sondern sie verändern auch den Übergang in die C-Typ Inaktivierung. Da in dem mutierten Kanal der inaktivierte Zustand ausgeschlossen werden kann, sind die Veränderungen in der Verapamil-Affinität (Tab. 2) in H399T Kanälen nur auf den Einfluss der intrazellulären Kationen zurückzuführen.

Kation	Wildtyp <i>hKv1.3</i> Kanal	Mutierter Kanal H399T
145 mM [K ⁺] _i	2,6 µM	2,1 µM
10 mM [K ⁺] _i	9,1 µM	5,6 µM
145 mM [Rb ⁺] _i	8,3 µM	3,3 µM
10 mM [Rb ⁺] _i	33,7 µM	5,5 µM

Tabelle 2: Die IC₅₀ Werte für Verapamil, Ströme durch Wildtyp *hKv1.3* Kanäle und mutierte H399T Kanäle unter verschiedenen Bedingungen zu reduzieren.

Die Kationen besetzen die Bindungsstellen im Selektivitätsfilter (Kapitel 1.4; Abb. 4A). In hohem K⁺ sind jeweils zwei Kaliumionen im Selektivitätsfilter und besetzen die Positionen 1 und 3 bzw. 2 und 4 (Zhou et al., 2003). In diesem Fall werden die Ströme durch die H399T Kanäle mit einem IC₅₀ von 2,1 µM reduziert (Tab 2). In hohem Rb⁺ (Abb. 9B) ist die Struktur im Vergleich zu hohem K⁺ ähnlich, d.h. es kommt zu keinen großen Strukturveränderungen, und die Ströme durch die mutierten Kanäle werden mit einem IC₅₀ von 3,3 µM inhibiert. Durch einen ähnlichen strukturellen Aufbau in hohem K⁺ und in hohem Rb⁺ wird die Verapamil-Affinität kaum verändert, sondern nur um einen Faktor von ~1,5 (Tab. 2). Bei geringen Konzentrationen an K⁺ sind die Bindungsstellen im Selektivitätsfilter gering besetzt und es kommt zu signifikanten strukturellen Veränderungen im

Bereich des Selektivitätsfilters verglichen zu hohem K^+ (Abb. 4C). Diese Strukturveränderung macht sich auch in der Verapamil-Affinität bemerkbar. In 10 mM $[K^+]_i$ reduzieren sich die Ströme durch die H399T Kanäle mit einem IC_{50} von 5,6 μ M und somit wirkt das Verapamil in 10 mM $[K^+]_i$ fast 3-mal schlechter als in 145 mM $[K^+]_i$ (Tab. 2). Vermutlich ist die Struktur im Bereich des Selektivitätsfilters in niedrigem Rb^+ so ähnlich aufgebaut wie in niedrigem K^+ . Eine ähnliche Struktur würde auch erklären, warum in mutierten H399T Kanälen in 10 mM $[K^+]_i$ und 10 mM $[Rb^+]_i$ eine fast identische Verapamil-Affinität ($\sim 5,5 \mu$ M; Tab. 2) besteht. Die strukturelle Veränderung kann die Bindung des Verapamils an seine Bindungsstelle beeinflussen, so dass die Bindungsstelle für Verapamil evtl. nicht mehr so gut zugänglich ist wie es unter physiologischen Bedingungen (hohes K^+) der Fall ist.

4.2 Charakterisierung der Verapamil Rückreaktion (Verlassen der Bindungsstelle)

Um die Bindungsstelle des Verapamils besser zu verstehen, wurden die Hin- und Rückreaktion („off-rate“) des Verapamils betrachtet. Von früheren Messungen von DeCoursey (1995) war bekannt, dass die Blockade der Kv1.3 Kanäle durch Verapamil eine Zustandsabhängigkeit aufweist. Verapamil kann in *h*Kv1.3 Kanälen nur den offenen und den inaktivierten Zustand aber nicht den geschlossenen Zustand blockieren (Abb. 5). Damit der Verapamil-blockierte Kanal in den geschlossenen Zustand übergehen kann, muss das Verapamil vorher seine Bindungsstelle verlassen. Je negativer das Potential ist, desto schneller verlässt Verapamil seine Bindungsstelle. Diese Tatsache spiegelt die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion wider. Diese Rückreaktion wurde schon in früheren Veröffentlichungen beschrieben, mit einer starken Spannungsabhängigkeit (e -fold/ -36 V) bei hyperpolarisierenden Potentialen negativer als -60 mV (Röbe et al., 2000). Diese Spannungsabhängigkeit könnte aufgrund der folgenden Möglichkeiten entstanden sein:

- a) Das positiv geladene Verapamil könnte das umgebende Membranfeld wahrnehmen und durch das negative Potential aus seiner Bindungsstelle gedrückt werden. In diesem Fall würde das negative Potential direkt auf das

Verapamilmolekül wirken und die Rückreaktion von Verapamil würde ohne jeglichen Einfluss von strukturellen Veränderungen im Kanal verlaufen.

- b) Das Verapamil könnte von seiner Bindungsstelle durch den spannungsabhängigen Eintritt von Kaliumionen rausgedrückt werden. Auch in diesem Fall wären, wie bei a, keine strukturellen Veränderungen im Kanal für die Rückreaktion des Verapamils verantwortlich.
- c) Die negative Spannung des Membranfeldes führt zu strukturellen Veränderungen im Kanal, wodurch es zur spannungsabhängigen Schließung kommt. Bevor der Kanal jedoch in den geschlossenen Zustand übergehen kann, muss Verapamil seine Bindungsstelle verlassen. Im Gegensatz zu a und b, wäre in diesem Fall die strukturelle Veränderung des Kanals für die Rückreaktion von Verapamil verantwortlich. Dieser Mechanismus würde auf eine Zustandsabhängigkeit des Verapamils hinweisen.

Um zu unterscheiden, ob die Rückreaktion von Verapamil auf die Spannungsabhängigkeit oder auf die Zustandsabhängigkeit zurückzuführen ist, habe ich versucht, Bedingungen zu schaffen, bei dem sich der Kanal bei Potentialen die negativer sind als -60 mV länger im offenen Zustand befindet als unter Kontrollbedingungen. Dieser Zustand wird mit hohem Rb^+ in der extrazellulären Lösung erreicht, wodurch die Deaktivierung 5-mal langsamer ist verglichen zu K^+ (Cahalan et al., 1985). Ist die Verapamil-Rückreaktion unter hohen Rb^+ Bedingungen identisch zu der unter hohen K^+ Bedingungen, dann würde Verapamil seine Bindungsstelle nur deshalb verlassen, weil ein verändertes Membranpotential auf das geladene Verapamil wirkt. Alternativ könnte die Verapamil-Rückreaktion zustandsabhängig sein, d.h. die Strukturveränderung des Kanals beim Schließvorgang könnte das Verapamil aus seiner Bindungsstelle drücken. In diesem Fall würde das Verapamil seine Bindungsstelle in hohen Rb^+ Bedingungen deutlich langsamer verlassen als unter Kontrollbedingungen in hohem K^+ . Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Versuche in der outside-out Konfiguration zunächst unter K^+ Bedingungen durchgeführt und später unter Rb^+ Bedingungen wiederholt.

4.2.1 Tail-Ströme mit hohem K^+ in der extrazellulären Lösung

Zunächst erfolgten die Versuche in den Wildtyp *hKv1.3* Kanälen unter Kontrollbedingungen mit hohem K^+ in der extrazellulären Lösung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. In Abwesenheit von Verapamil (helle Spuren; Abb. 13A) wurden die Kanäle durch einen depolarisierenden Puls von -120 mV auf +60 mV für 50 ms aktiviert und gehen infolgedessen vom geschlossenen in den offenen Zustand über ($C \rightarrow O$). Der Auswärtsstrom erreichte innerhalb von 15 - 20 ms einen Spitzenwert. Der anschließende hyperpolarisierende Puls führte zu einem einwärtsgerichteten Tail-Strom, welcher mono-exponential abnimmt. Dieser Vorgang wird als Deaktivierung bezeichnet. Die Kanäle gehen dabei von dem offenen in den geschlossenen Zustand über ($O \rightarrow C$). Die Zeitkonstante für die Deaktivierung (τ_t) wurde mittels eines mono-exponentialen Fits an den Tail-Strom ermittelt und entsprach z.B. 22 ± 9 ms ($n = 4$) bei -160 mV. Aus der Deaktivierungs-Zeitkonstante (τ_t) konnte die Deaktivierungs-Ratenkonstante 4β ($4\beta = 1/\tau_t$) bestimmt werden. Die Ratenkonstanten für die Deaktivierung wurden gegen die verwendeten Potentiale aufgetragen (Abb. 13B). Die durchgezogene Linie in Abbildung 13B stellt einen mono-exponentialen Fit an die Deaktivierungs-Ratenkonstanten mit einer Steigung von -0,014 dar. Mithilfe der Steigung wurde eine Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung von e-fold/-71 mV in *hKv1.3* Kanälen in hohem $[K^+]_e$ erhalten. Die so ermittelte Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung war nicht so steil wie die Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung in *mKv1.3* Kanälen (e-fold/-36 mV; Röse et al., 2000) bzw. in *rKv1.3* Kanälen (e-fold/-43 mV; DeCoursey, 1995), was eventuell auf die verschiedenen Spezies (Maus/Ratte gegenüber Mensch) und/oder auf die Messtechnik (whole-cell gegenüber outside-out) zurückzuführen sein könnte.

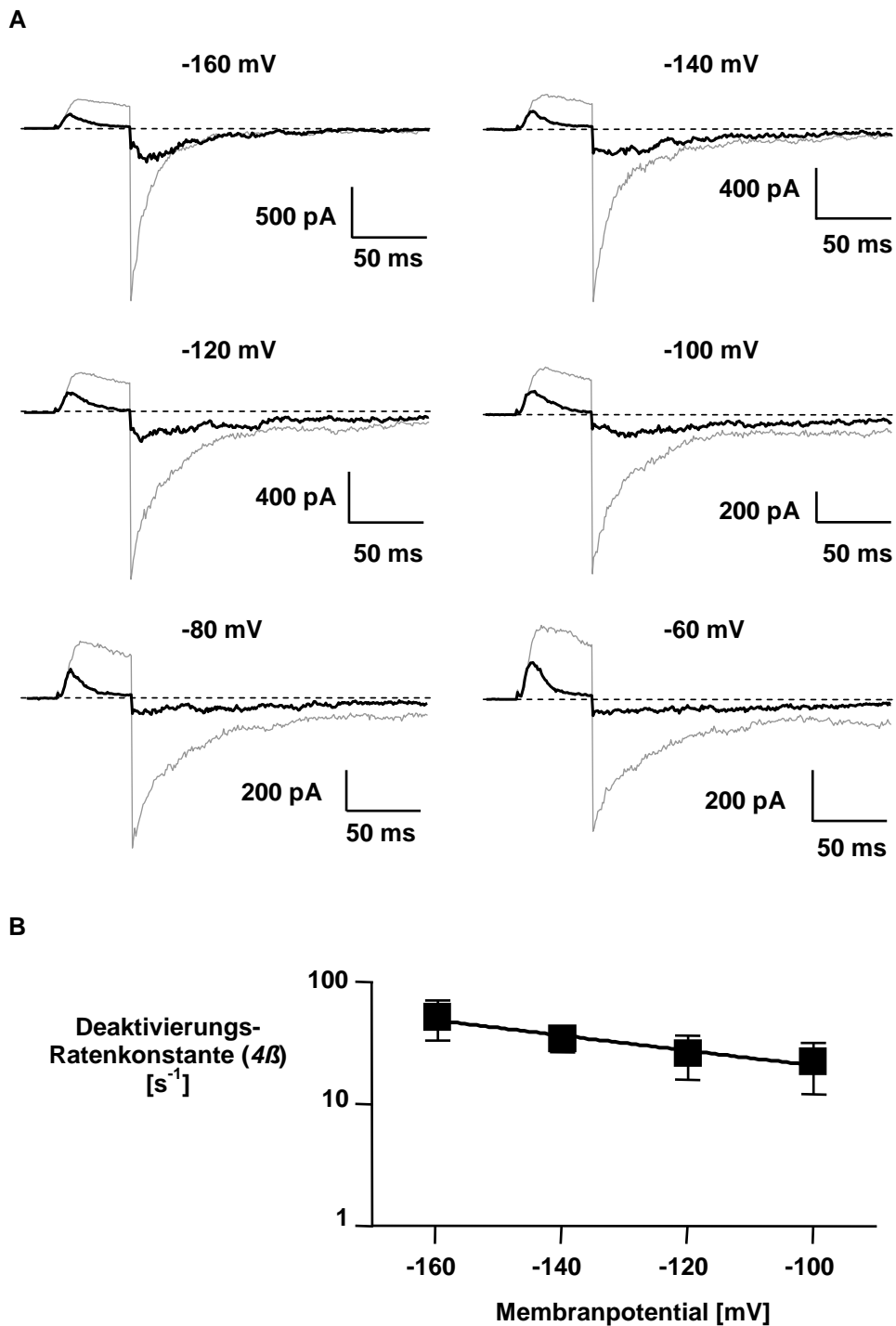


Abbildung 13: Eigenschaften von Verapamil, Ströme durch den Wildtyp *hKv1.3* Kanal in hohem $[K^+]_e$ zu blockieren. (A) Die Ströme wurden in der outside-out Konfiguration induziert, indem vom Haltepotential (-120 mV) auf +60 mV (50 ms) depolarisiert und anschließend auf verschiedene Potentiale (200 ms) hyperpolarisiert wurde. Die gezeigten Ströme wurden in Abwesenheit (helle Spuren) und in Anwesenheit (dunkle Spuren) von 50 μ M Verapamil gewonnen. (B) Deaktivierungs-Ratenkonstanten 4β ($n = 4$), wurden aus den Deaktivierungs-Zeitkonstanten τ_t berechnet ($4\beta = 1/\tau_t$). Die Zeitkonstanten (τ_t) wurden ermittelt durch einen mono-exponentialen Fit an die Tail-Ströme ohne Verapamil aus A. Die Deaktivierungs-Ratenkonstanten (4β) wurden gegen das

verwendete Membranpotential aufgetragen. Die durchgezogene Linie repräsentiert einen mono-exponentialen Fit an die Daten mit einer Steigung von $-0,014 \text{ mV}^{-1}$, was einer Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung von $e\text{-fold}/-71 \text{ mV}$ entspricht.

In Anwesenheit von $50 \mu\text{M}$ Verapamil (Abbildung 13A, dunkle Spuren) gingen die *hKv1.3* Kanäle während des depolarisierenden Pulses zunächst in den offenen Zustand über ($C \rightarrow O$). Anschließend wurden die Ströme durch den Kanal bis zum Ende des depolarisierenden Pulses annähernd komplett durch Verapamil blockiert ($O \rightarrow OB$). Während des anschließenden hyperpolarisierenden Pulses konnte ein „Hook“ in den Tail-Strömen ausgemacht werden. Dieser Hook beschreibt einen anfänglichen Anstieg des einwärtsgerichteten Stromes bis zu einem Spitzenwert ($OB \rightarrow O$) mit einer anschließenden Abnahme des Einwärtstromes gegen Null ($O \rightarrow C$). Der anfängliche Anstieg im Tail-Strom zeigt die Aufhebung des Verapamil-Blocks. Um die Ratenkonstante für die Verapamil-Rückreaktion ℓ bei verschiedenen Potentialen von dem Hook im Tail-Strom zu ermitteln, musste eine Simulation des Tail-Stromes basierend auf der Gleichung 2 erfolgen. Der Tail-Strom nach der Zugabe von Verapamil in hohem $[K^+]_e$ wurde auf den Spitzenwert des Tail-Stromes ohne Verapamil normalisiert und ist in Abbildung 14A bei einem Potential von -160 mV dargestellt (graue Spur). Am Anfang des hyperpolarisierenden Pulses sind die meisten Kanäle im offen-blockierten Zustand (OB) und gehen dann in den offenen Zustand (O) über. Nach etwa 13 ms erreichte der Stromverlauf einen Spitzenwert, wovon die Kanäle entweder in den geschlossenen Zustand (C) übergehen oder wieder von Verapamil blockiert werden können. Der Zeitverlauf des Tail-Stromes wurde simuliert (schwarze Spur), um die Ratenkonstante der Verapamil-Rückreaktion ℓ zu bestimmen, die in diesem Fall einer Konstante von 30 s^{-1} entspricht. Die durch die Simulation erhaltenen Ratenkonstanten für die Verapamil-Rückreaktion ℓ bei verschiedenen negativen Potentialen wurden gegen die verwendeten Membranpotentiale aufgetragen (Abb. 14B). Die durchgezogene Linie in Abbildung 14B repräsentiert einen mono-exponentialen Fit durch die Daten, wodurch sich eine Steigung von $-0,0126 \text{ mV}^{-1}$ ergibt. Diese Steigung entspricht einer Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion ℓ von $e\text{-fold}/-79 \text{ mV}$ in hohem $[K^+]_e$.

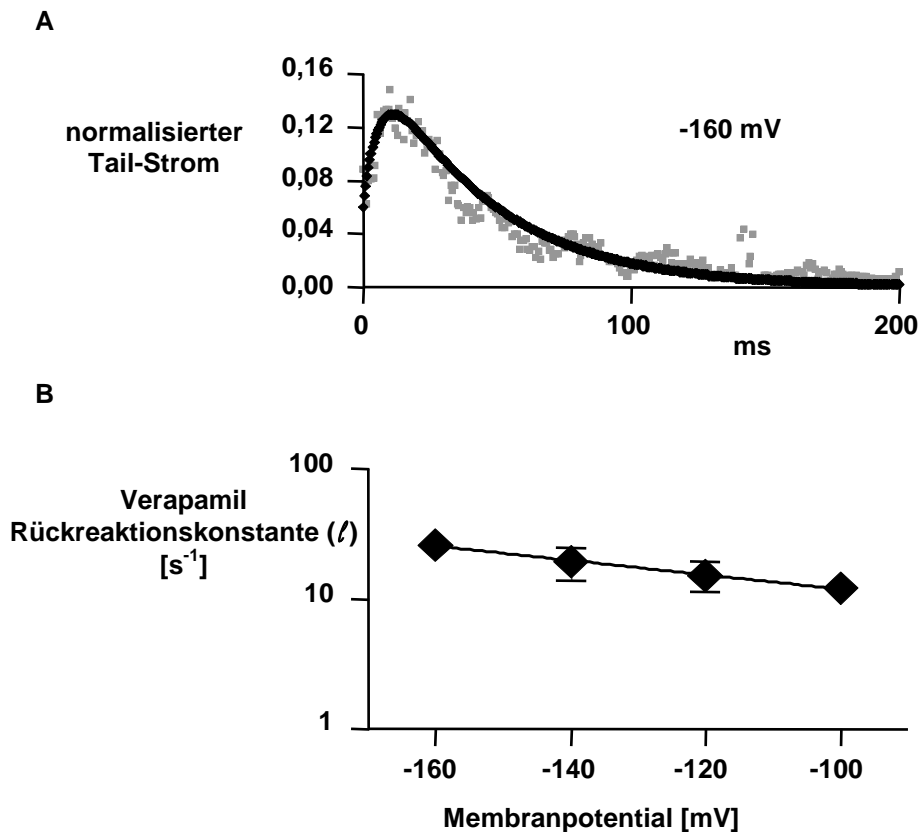


Abbildung 14: (A) Tail-Strom aus der Abbildung 13A bei -160 mV in Anwesenheit von 50 μ M Verapamil (graue Spur) normalisiert auf den Spitzenwert des Tail-Stromes ohne Verapamil. Die schwarze Spur demonstriert die Simulation des Stromes basierend auf der Gleichung 2. (B) Die Rückreaktionskonstante (ℓ) für Verapamil ($n = 4$), wurde aus der Simulation gewonnen und gegen das Membranpotential aufgetragen. Die durchgezogene Linie zeigt einen mono-exponentialen Fit an die Daten mit einer Steigung von $-0,0126 \text{ mV}^{-1}$, was auf eine Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktionskonstante von e-fold/-79 mV hinweist.

Die Ähnlichkeit zwischen der Spannungsabhängigkeit für die Deaktivierung in *hKv1.3* Kanäle (e-fold/-71 mV), d.h. die Spannungsabhängigkeit für die Schließung der Kanäle und die der Verapamil-Rückreaktionskonstante (e-fold/-79 mV) weisen darauf hin, dass die Spannungsabhängigkeit für die Verapamil-Rückreaktion durch die spannungsabhängige Schließung der Kanäle verursacht sein könnte. Zu einem ähnlichen Schluss führen die Werte in den Veröffentlichungen von Röbe *et al.* (2000) als auch die von DeCoursey (1995). Die Werte für die Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung ($O \rightarrow C$) (e-fold/-35 mV in *mKv1.3*; e-fold/-40 mV in *rKv1.3*) sind vergleichbar mit den Werten für die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion (e-fold/-36 mV in *mKv1.3*; e-fold/-43 mV in *rKv1.3*). Der Grund für die steilere Spannungsabhängigkeit in der

Verapamil-Rückreaktion bei Röbe *et al.* (2000) und DeCoursey (1995) verglichen zu dieser Arbeit könnte wie für die Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung auf die verschiedenen Spezies (Maus/Ratte gegenüber Mensch) und/oder auf die Messtechnik (whole-cell gegenüber outside-out) zurückzuführen sein.

4.2.2 Tail-Ströme mit hohem Rb^+ in der extrazellulären Lösung

Um die Kanäle bei negativeren Potentialen als -60 mV länger im offenen Zustand zu halten, d.h. eine langsame Deaktivierung herbeizuführen, wurde extrazelluläres Rb^+ verwendet. Es wurde schon beschrieben, dass Rb^+ die Deaktivierung um einen Faktor von 5, verglichen zu K^+ , in der extrazellulären Lösung verlangsamt (Cahalan *et al.*, 1985). Eine langsame Deaktivierung der Kanäle bei negativen Potentialen könnte dazu beitragen zu unterscheiden, ob Verapamil seine Bindungsstelle spannungs- oder zustandsabhängig verlässt. Deshalb wurden in hohem $[Rb^+]_e$ die gleichen Experimente wie in hohem $[K^+]_e$ durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der Abbildung 15 dargestellt. Die Ströme durch den *hKv1.3* Kanal wurden wie vorher für K^+ beschrieben durchgeführt, wobei hohes Rb^+ in der extrazellulären Lösung war. Die Stromspuren in hohem $[Rb^+]_e$ ohne die Zugabe von Verapamil (Abb. 15A, helle Spuren) waren vergleichbar mit den Stromspuren in hohem $[K^+]_e$ (Abb. 13A), jedoch war die Deaktivierung in hohem $[Rb^+]_e$ langsamer als in hohem $[K^+]_e$. Bei -160 mV war beispielsweise die Zeitkonstante für die Deaktivierung (τ_t) 112 ± 41 ms ($n = 4$) verglichen zu 22 ms in hohem $[K^+]_e$, was darauf hinweist, dass die Deaktivierung in hohem $[Rb^+]_e$ ~5-mal langsamer war als in hohem $[K^+]_e$. Diese Beobachtung stimmt mit den veröffentlichten Daten von Cahalan und Kollegen (1985) überein. In Abbildung 15B ist die Ratenkonstante für die Deaktivierung (4β) gegen das Membranpotential aufgetragen wie es schon für die Abbildung 13B beschrieben worden ist. Mithilfe eines mono-exponentialen Fits (durchgezogene Linie) wurde eine Steigung von -0,0286 mV ermittelt, was einer Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung in *hKv1.3* Kanälen von e-fold/-35 mV in hohem $[Rb^+]_e$ entspricht.

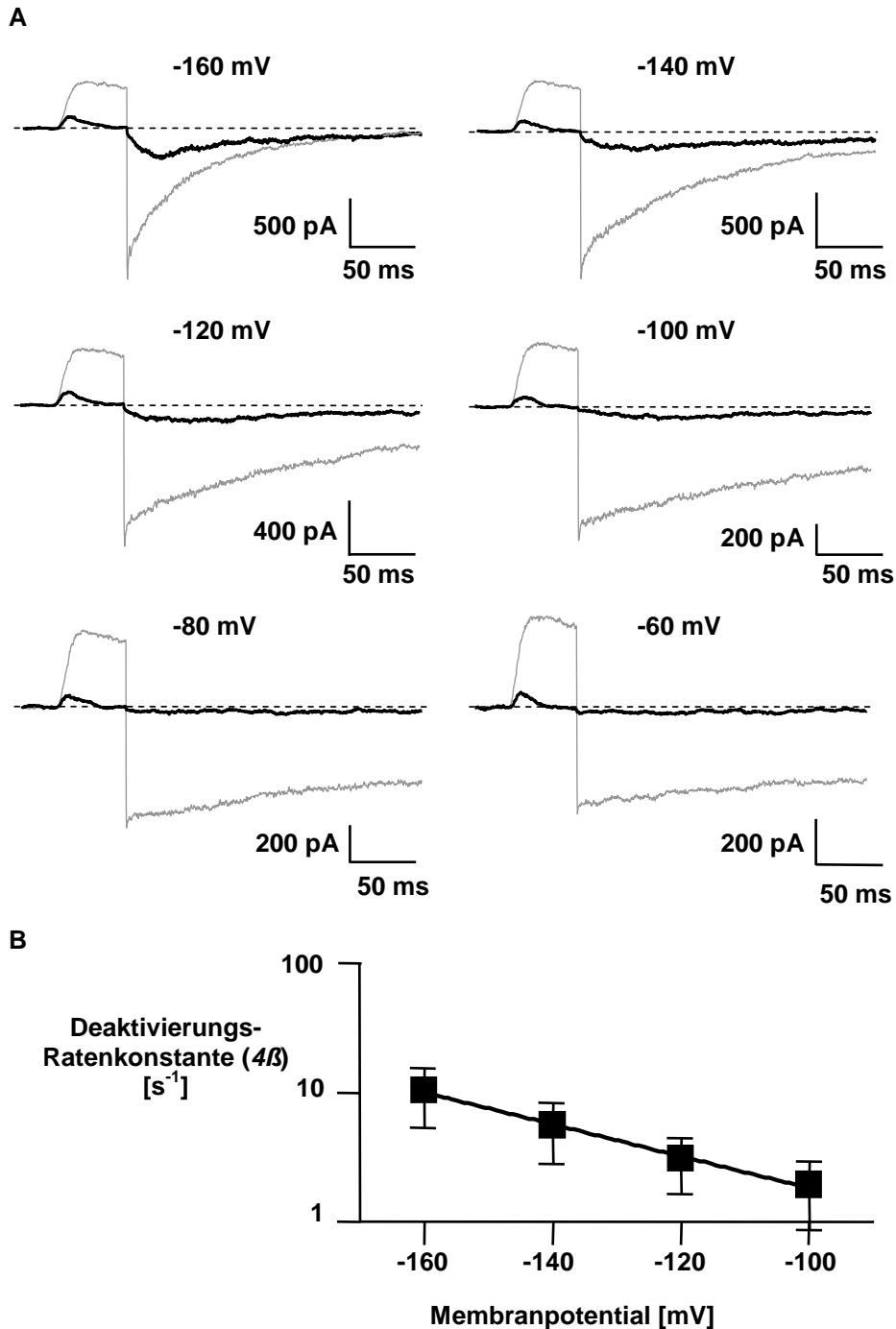


Abbildung 15: Eigenschaften von Verapamil Ströme durch den Wildtyp *hKv1.3* Kanal in hohem $[Rb^+]_e$ zu blockieren. (A) Die Ströme wurden aufgezeichnet wie für Abbildung 13A beschrieben. Die gezeigten Ströme wurden in Abwesenheit (helle Spuren) und in Anwesenheit (dunkle Spuren) von $50 \mu M$ Verapamil gewonnen. (B) Deaktivierungs-Ratenkonstante 4β ($n = 4$), wurden gewonnen wie in Abbildung 13B beschrieben und gegen das verwendete Membranpotential aufgetragen. Die durchgezogene Linie repräsentiert einen mono-exponentialen Fit an die Daten mit einer Steigung von $-0,0286 \text{ mV}^{-1}$, was einer Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung von e-fold/-35 mV entspricht.

Die dunklen Stromspuren in Abbildung 15A wurden in hohem $[Rb^+]_e$ und nach der Applikation von 50 μM Verapamil aufgezeichnet. Wie auch in hohem $[K^+]_e$ waren die Ströme durch die $hKv1.3$ Kanäle in hohem $[Rb^+]_e$ am Ende des depolarisierenden Pulses komplett durch das Verapamil blockiert. Im anschließenden Tail-Strom konnte ebenfalls ein „Hook“ beobachtet werden. Von diesem Hook konnte die Zeitkonstante zu dem Spitzenwert des einwärtsgerichteten Stromes bestimmen werden, welcher beispielsweise einem Wert von 17 ± 7 ms ($n = 4$) bei -160 mV bzw. 91 ± 41 ms ($n = 5$) bei -100 mV in hohem $[Rb^+]_e$ entsprach (Abb. 15A), verglichen zu 4 ± 0.9 ms ($n = 4$) bei -160 mV bzw. 15 ± 1 ms ($n = 3$) bei -100 mV in hohem $[K^+]_e$ (Abb. 13A). Die Zeitkonstanten zu dem Spitzenwert des einwärtsgerichteten Stromes waren demnach ~ 4 -6 mal langsamer in hohem $[Rb^+]_e$ verglichen zu denen in hohem $[K^+]_e$, was auf eine Korrelation zwischen der Geschwindigkeit der Deaktivierung und der Geschwindigkeit von dem Verlassen des Verapamils von seiner Bindungsstelle hinweist. Darüber hinaus bestimmte ich von dem Hook des Tail-Stromes die Ratenkonstante der Verapamil-Rückreaktion bei verschiedenen Potentialen mittels einer Simulation des Stromes basierend auf der Gleichung 2. Die graue Spur in Abbildung 16A zeigt einen normalisierten Tail-Strom in hohem $[Rb^+]_e$ bei -160 mV nach der Zugabe von Verapamil und die dunkle Spur stellt die Simulation dar. Am Anfang des hyperpolarisierenden Pulses sind die meisten Kanäle in dem offen-blockierten Zustand (OB) und gehen über in den offenen Zustand (OB \rightarrow O) bis sie einen Spitzenwert nach ~ 27 ms erreichen. Anschließend gehen die Kanäle entweder in den geschlossenen Zustand über (O \rightarrow C) oder werden wieder von Verapamil blockiert (O \rightarrow OB). In diesem Beispiel (Abb. 16A) ermittelte ich mittels der Simulation einen Wert von 20 s $^{-1}$ für die Ratenkonstante der Verapamil-Rückreaktion mit einer ähnlichen Deaktivierungs-Ratenkonstante wie ohne Verapamil in hohem $[Rb^+]_e$. Die durch die Simulation ermittelten Werte der Ratenkonstante für die Verapamil-Rückreaktion in hohem $[Rb^+]_e$ wurden gegen das verwendete Membranpotential aufgetragen (Abb. 16B). Die durchgezogene Linie in Abbildung 16B zeigt den mono-exponentialen Fit mit einer Steigung von -0,012 mV, was eine Spannungsabhängigkeit von e-fold/-83 mV angibt.

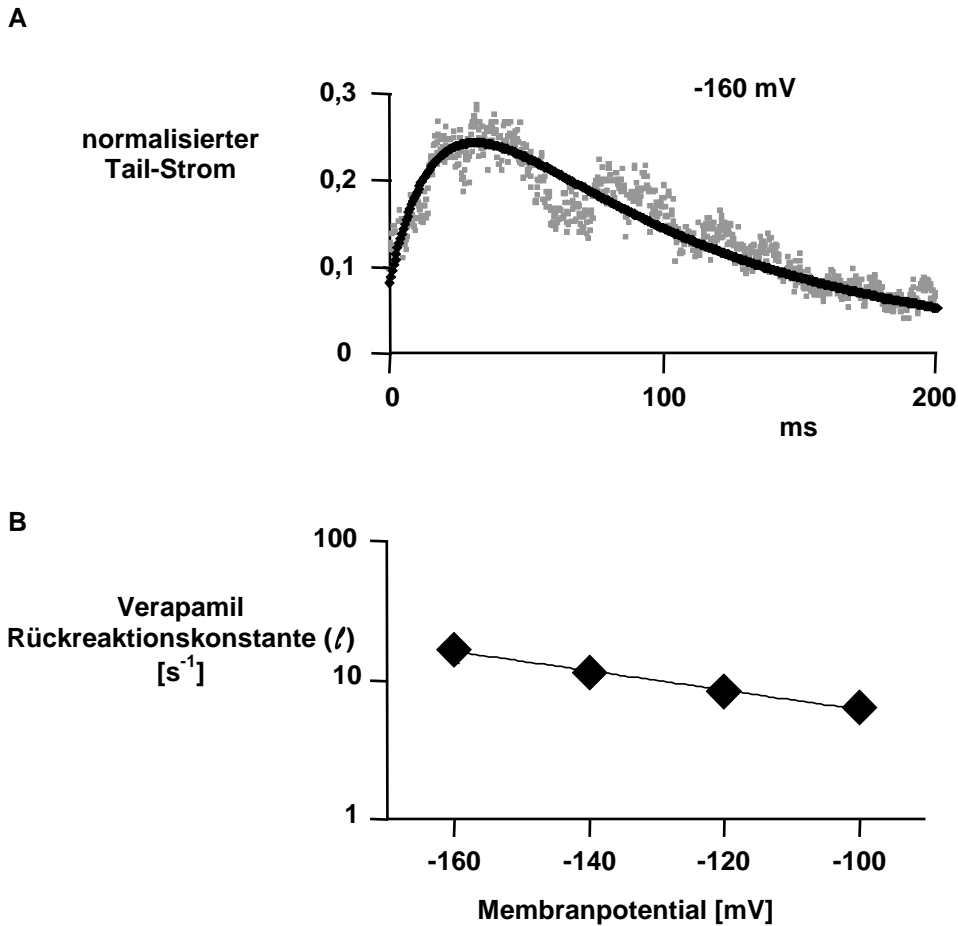


Abbildung 16: (A) Tail-Strom aus der Abbildung 15A bei -160 mV in Anwesenheit von 50 μM Verapamil (graue Spur) normalisiert auf den Spitzenwert des Tail-Stromes ohne Verapamil. Die schwarze Spur demonstriert die Simulation des Stromes basierend auf der Gleichung 2. (B) Die Rückreaktionskonstanten für Verapamil ℓ ($n = 4$), wurde aus der Simulation gewonnen und gegen das Membranpotential aufgetragen. Die durchgezogene Linie zeigt einen mono-exponentialen Fit an die Daten mit einer Steigung von $-0,012 \text{ mV}^{-1}$, was auf eine Spannungsabhängigkeit der Verapamil Rückreaktion von e-fold/-83 mV hinweist.

Die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion in hohem $[\text{Rb}^+]_e$ (e-fold/-83 mV) war vergleichbar mit der Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion in hohem $[\text{K}^+]_e$ (e-fold/-79 mV), obwohl die absoluten Werte der Rückreaktionskonstanten ℓ (Abb. 14B, Abb. 16B) verschieden waren. Die Mittelwerte für die Rückreaktionskonstanten ℓ waren in hohem $[\text{K}^+]_e$ $26 \pm 3 \text{ s}^{-1}$ ($n = 4$) bei -160 mV bzw. $12 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ ($n = 4$) bei -100 mV verglichen zu $17 \pm 3 \text{ s}^{-1}$ ($n = 3$) bei -160 mV bzw. $7 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ ($n = 3$) bei -100 mV in hohem $[\text{Rb}^+]_e$.

Durch die langsamere Rückreaktion von Verapamil unter hohen $[\text{Rb}^+]_e$ Bedingungen verglichen zu den Kontrollbedingungen in hohem $[\text{K}^+]_e$ komme ich zu

dem Schluss, dass die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion nicht im Wesentlichen durch die positive Ladung des Verapamils, welches das elektrische Feld der Membran spürt und daraufhin seine Bindungsstelle verlässt, verursacht wird. Alternative Interpretationen für die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion könnten zum einen auf die Zustände des Kanals selbst (Zustandsabhängigkeit) zurückzuführen sein oder es könnte von dem spannungsabhängigen Eintritt von K^+ in den Kanal (Armstrong, 1971) verursacht werden.

4.2.3 Einfluss vom spannungsabhängigen Eintritt von K^+ auf die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion

Armstrong (1971) beobachtete in K^+ Kanälen der Riesenaxone des Tintenfisches, dass bei hyperpolarisierenden Potentialen extrazelluläre Kaliumionen die TEA (Tetraethylammonium) Ionen von ihrer intrazellulären Bindungsstelle durch eine einwärtsgerichtete Bewegung von K^+ in den Kanal verdrängen können. Das bedeutet, dass durch eine Erhöhung der externen K^+ Konzentration die Ratenkonstante für die Dissoziation von intrazellulärem TEA^+ von seiner Bindungsstelle zunimmt. Ein einfaches Experiment, um diese Möglichkeit zu beweisen bzw. zu widerlegen war die vorher beschriebenen Messungen in $[K^+]_e$ bzw. $[Rb^+]_e$ zu wiederholen und zwar in hohem $[Na^+]_e$. Aufgrund der stärkeren C-Typ Inaktivierung in hohem $[Na^+]_e$ in Wildtyp *hKv1.3* Kanälen wurden in diesen Messungen die mutierten H399T Kanäle verwendet (Rauer et al., 1996; Dreker et al., 2005). Abbildung 17A zeigt den Strom durch die H399T Kanäle in Abwesenheit (helle Spuren) und in Anwesenheit (dunkle Spuren) von 100 μ M Verapamil bei einem hyperpolarisierenden Potential von -160 mV. Im vergrößerten Teil des Stromes (Abb. 17B) kann ein Hook im Tail-Strom beobachtet werden. Anhand des Hook konnte die Ratenkonstante für die Verapamil-Rückreaktion durch eine Simulation des Tail-Stromverlaufes basierend auf der Gleichung 2 bestimmt werden. In Abbildung 17C wurden die durch die Simulation erhaltenen Ratenkonstanten für die Verapamil-Rückreaktion bei verschiedenen Potentialen in hohem $[Na^+]_e$ gegen das Membranpotential aufgetragen. Die durchgezogene Linie in Abbildung 17C stellt den mono-exponentialen Fit mit einer Steigung von

$-0,0145 \text{ mV}^{-1}$ dar, was einer Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion von e-fold/-69 mV entspricht.

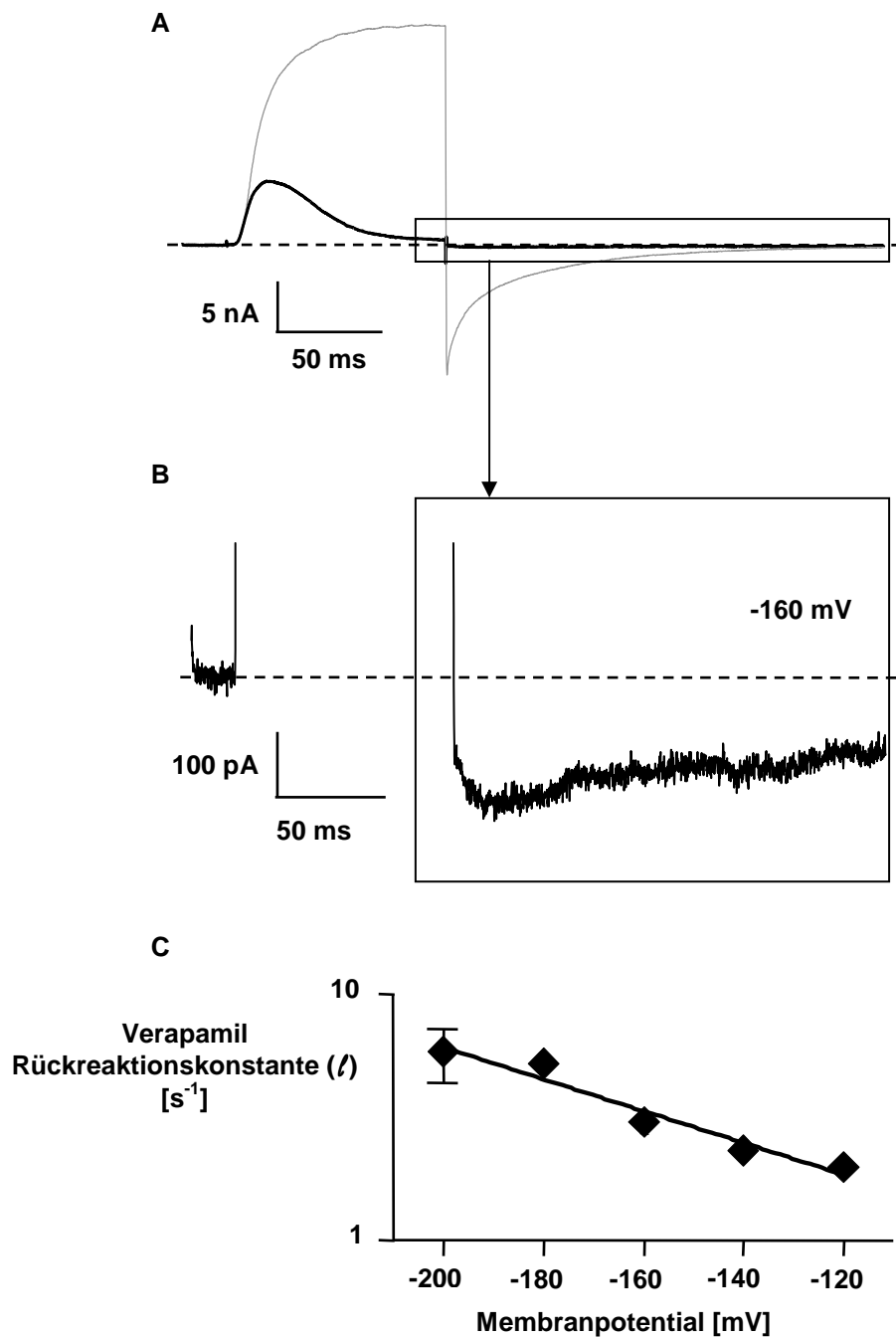


Abbildung 17: Ströme durch den mutierten Kanal H399T in Abwesenheit (helle Spuren) und in Anwesenheit (dunkle Spuren) von $100 \mu\text{M}$ Verapamil in $[\text{Na}^+]_e$. (A) Die Ströme wurden in der whole-cell Konfiguration induziert, indem vom Haltepotential (-120 mV) auf +60 mV (100 ms) depolarisiert und anschließend auf -160 mV (200 ms) hyperpolarisiert wurde. (B) Vergrößerte Darstellung des Stromes nach Applikation von Verapamil aus A, um den Hook zu verdeutlichen. (C) Die Verapamil-Rückreaktionskonstanten ℓ , wurden aus den Simulationen gewonnen und gegen

das Membranpotential aufgetragen. Die durchgezogene Linie zeigt einen mono-exponentialen Fit an die Daten mit einer Steigung von $-0,0145 \text{ mV}^{-1}$ was auf eine Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktionskonstante von e-fold/-69 mV in $[\text{Na}^+]_e$ hinweist.

Die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion in hohem $[\text{Na}^+]_e$ (e-fold/-69 mV) war vergleichbar mit der Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion in hohem $[\text{K}^+]_e$ (e-fold/-79 mV) bzw. in hohem $[\text{Rb}^+]_e$ (e-fold/-83 mV). Bei diesem Ergebnis würde man davon ausgehen, dass die Rückreaktion des Verapamils durch strukturelle Veränderungen im Kanal, d.h. dem Übergang vom offenen in den geschlossenen Zustand, verursacht wird. Allerdings weisen die Absolutwerte der Verapamil-Rückreaktionskonstanten ℓ in hohem $[\text{Na}^+]_e$, $[\text{K}^+]_e$, und $[\text{Rb}^+]_e$ eher darauf hin, dass der von Armstrong (1971) beschriebene spannungsabhängige Eintritt der Kaliumionen in den Kanal, wie er es für den nachlassenden Block durch TEA^+ beschrieben hatte, eine mögliche Erklärung für die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion liefern könnte, denn in hohem $[\text{Na}^+]_e$ waren die Zeitkonstanten für die Deaktivierung der Kanäle 2-mal schneller als in hohem $[\text{K}^+]_e$ (Cahalan et al., 1985), die Verapamil-Rückreaktion (bei -160 mV) in hohem $[\text{Na}^+]_e$ war aber ~ 10 -mal langsamer als in hohem $[\text{K}^+]_e$. Die Rückreaktionskonstante für Verapamil war in hohem $[\text{Na}^+]_e$ $3 \pm 0.31 \text{ s}^{-1}$ ($n = 3$) verglichen zur Rückreaktionskonstante von $26 \pm 6.7 \text{ s}^{-1}$ ($n = 4$) in hohem $[\text{K}^+]_e$. Die Verapamil-Rückreaktion in hohem $[\text{Na}^+]_e$ könnte deshalb langsamer gewesen sein, verglichen zur Rückreaktion in hohem $[\text{K}^+]_e$, weil weniger Kaliumionen (4,5 mM) in der extrazellulären Lösung den spannungsabhängigen Eintritt von K^+ in den Kanal limitiert hätten.

Eine alternative Möglichkeit zum spannungsabhängigen Eintritt der Kaliumionen in den Kanal, die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion zu erklären, könnte der Zustand des Kanals liefern, d.h. die mit dem spannungsabhängigen Schließungsvorgang verbundene Strukturveränderung im Kanalprotein. Ein möglicher Hinweis für solch eine Zustandsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion sind die Ähnlichkeiten in der Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion in hohem $[\text{Na}^+]_e$, $[\text{K}^+]_e$, und $[\text{Rb}^+]_e$. Wenn der Zustand des Kanals (offen, geschlossen) allerdings für die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion verantwortlich sein soll, dann müssten in *hKv1.3* Kanälen zwei verschiedene leitende Konformationen vorhanden sein, die die Kanäle bei hyperpolarisierenden Potentialen nach einer Depolarisation eingehen, bevor die

Kanäle endgültig in den geschlossenen Zustand übergehen, weil im Hook die Kanäle zunächst in einen nicht-blockierten leitenden Zustand übergehen und dann erst in den geschlossenen Zustand. Um zwei offene Zustände in *hKv1.3* Kanälen kinetisch zu beweisen, wurde der zeitliche Verlauf der Deaktivierung im Tail-Strom nach einem vorangehenden depolarisierenden Puls mit unterschiedlicher Dauer untersucht.

4.2.4 Einfluss der Dauer der Depolarisation auf den zeitlichen Verlauf des Tail-Stromes in H399T Kanälen

Um die Existenz von mehr als einen offenen Zustand nachzuweisen, wurde der zeitliche Verlauf der Schließung der Kanäle (Deaktivierung) in Tail-Strömen untersucht. Ein Hinweis für einen zweiten offenen Zustand wäre die Abhängigkeit der Zeitkonstante der Deaktivierung von der Dauer des depolarisierenden Pulses. Um den Einfluss der C-Typ Inaktivierung auszuschließen wurden die mutierten H399T Kanäle verwendet. Die Tail-Ströme bei -100 mV bzw. -160 mV durch die H399T Kanäle wurden nach verschieden langen Depolarisationen gemessen (Abb. 18). Nach einem 15 ms Sprung auf den depolarisierenden Puls von +100 mV wurden die Kanäle aktiviert und gingen von dem geschlossenen in den offenen Zustand (C → O) über. Der anschließende hyperpolarisierende Puls auf -100 mV deaktivierte die Kanäle mit einer Zeitkonstante von 44 ms (Abb. 18A). Nach einem 500 ms Sprung auf +100 mV verlangsamte sich die Deaktivierung bei -100 mV auf eine Zeitkonstante von 67 ms (Abb. 18A). Der Vergleich zwischen der kürzeren (15 ms) und der längeren (500 ms) Depolarisation auf +100 mV zeigte, dass die Deaktivierung bei -100 mV um einen Faktor von ~1,5 durch eine längere Depolarisierung langsamer wurde. In anderen Zellen wurde ein ähnlicher Effekt auf die Zeitkonstante der Deaktivierung beobachtet, wobei sich die Deaktivierung nach einem 500 ms Puls auf +100 mV um einen Faktor von 2 ± 0.5 ($n = 3$), verglichen zu einem 15 ms Puls, verringert hatte. Abbildung 18B demonstriert die langsamere Abnahme des Tail-Stromes bei -100 mV nach einem 500 ms depolarisierenden Puls verglichen zu dem Strom nach einen 15 ms Puls auf +100 mV, was auf eine Abhängigkeit zwischen der Dauer der Depolarisation und der Zeitkonstante der Deaktivierung hinweist. Die Schließung des Kanals war bei dem hyperpolarisierenden Puls auf -160 mV schneller als bei -100 mV. Nach

15 ms auf +100 mV und dem anschließenden hyperpolarisierendem Puls auf -160 mV gehen die Kanäle in den geschlossenen Zustand mit einer Deaktivierungs-Zeitkonstante von 18 ms (Abb. 18C). Die Zeitkonstante für die Deaktivierung bei -160 mV war 33 ms nach einem 500 ms Puls auf +100 mV (Abb. 18C). Verglichen mit dem 15 ms Sprung auf +100 mV war die Schließung der Kanäle um einen Faktor von $\sim 1,8$ nach 500 ms auf dem depolarisierenden Puls verlangsamt (Abb. 18D). Diese Beobachtung stimmt mit den Messungen in anderen Zellen überein, wodurch sich die Messungen nach 15 ms und nach 500 ms auf +100 mV um einen Faktor von 1.6 ± 0.2 ($n = 3$) unterscheiden. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Deaktivierung des Kanals sich verlangsamt indem die Dauer des depolarisierenden Pulses erhöht wird, was die Existenz eines zweiten offenen Zustands der *hKv1.3* Kanäle bestärkt.

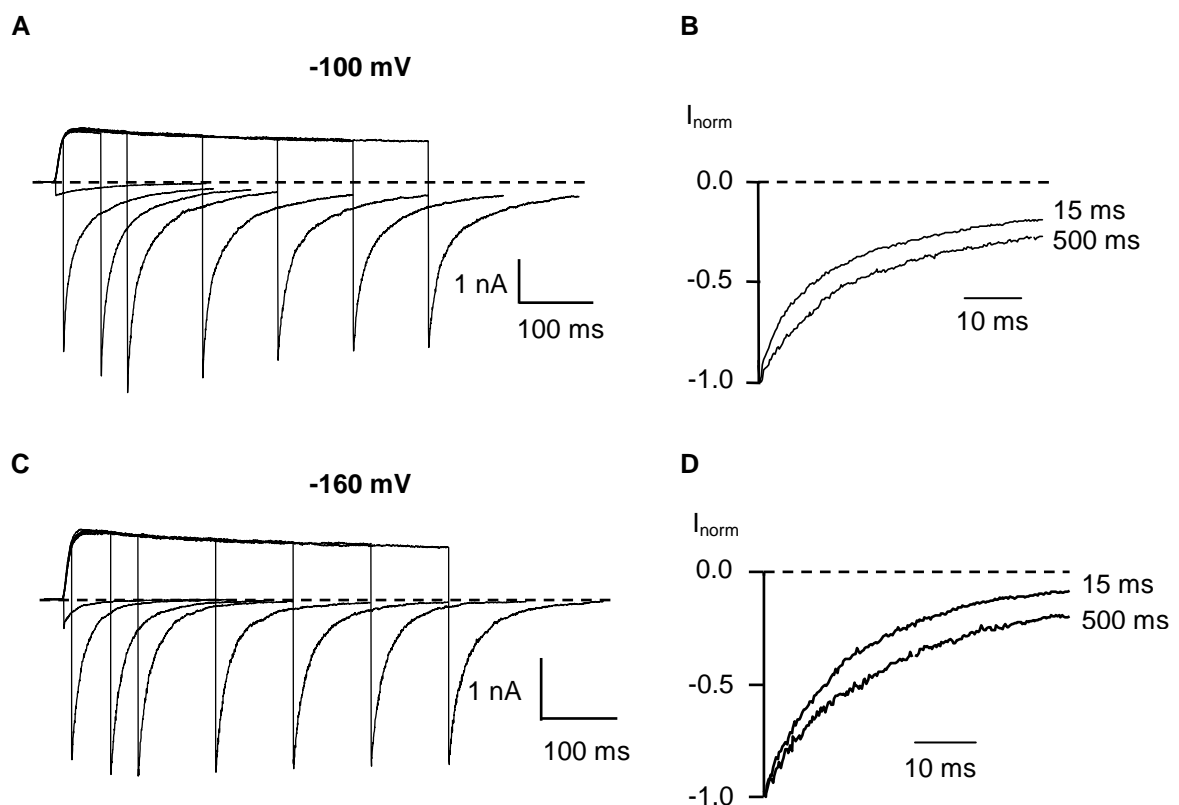


Abbildung 18: Einfluss der Dauer der Depolarisation auf den zeitlichen Verlauf der Tail-Ströme im mutierten Kanal H399T in hohem $[K^+]_e$. (A) Tail-Ströme wurden in der outside-out Konfiguration induziert, indem vom Haltepotential (-120 mV) auf +100 mV verschieden lang depolarisiert und anschließend auf -100 mV (200 ms) hyperpolarisiert wurde. (B) Auf den Spitzenwert des Tail-Stromes normalisierte Tail-Ströme nach 15 und 500 ms langer Depolarisation auf +100 mV von A. (C) Tail-Ströme wurden aufgezeichnet wie bei (A) beschrieben, jedoch mit einem

hyperpolarisierenden Puls auf -160 mV. (D) Auf den Spitzenwert des Tail-Stromes normalisierte Tail-Ströme nach 15 und 500 ms langer Depolarisation auf +100 mV von C.

5. Diskussion

Das Ziel dieser Studie war den Einfluss der intrazellulären als auch der extrazellulären Kationen auf die Verapamil Affinität in *hKv1.3* Kanälen zu untersuchen. Eine Veränderung der Kationenkonzentration könnte in den Kanälen die Verapamil-Blockade modulieren. Und tatsächlich veränderten intrazelluläres K^+ bzw. Rb^+ die Verapamil Affinität, obwohl ein Teil dieser Veränderung im Wildtyp *hKv1.3* Kanal vermutlich durch einen veränderten Übergang in den C-Typ inaktivierten Zustand zustande kam. Die Messungen in mutierten H399T Kanälen zeigten, dass auch die Kationen in der intrazellulären Lösung selbst zu einer Veränderung in der Verapamil-Affinität führten. Extrazelluläres K^+ bzw. Rb^+ beeinflussten die Rückreaktion (off-rate) des Verapamils von seiner Bindungsstelle bei hyperpolarisierenden Potentialen. In diesem Fall kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt auf den spannungsabhängigen Eintritt von Kaliumionen zurückzuführen ist, was einem Rausdrücken des Verapamils durch Kationen aus seiner Bindungsstelle bedeuten würde. Jedoch bevorzuge ich die Hypothese, dass die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion aus der spannungsabhängigen Schließung des Kanals hervorgeht. Diese Hypothese würde jedoch die Existenz eines zweiten offenen Zustandes im *hKv1.3* Kanal voraussetzen, was durch die kinetischen Eigenschaften der Deaktivierungs-Zeitkonstanten nach verschiedener Dauer bei den vorhergehenden depolarisierenden Pulsen bestärkt wurde.

5.1 Rolle der intrazellulären K^+ und Rb^+ auf die Verapamil Affinität

In Wildtyp *hKv1.3* Kanälen war der Effekt des Verapamils deutlich durch die intrazellulären Kationen beeinflusst. Die Veränderung in der Verapamil Affinität in Wildtyp *hKv1.3* Kanälen, induziert durch die intrazellulären Kationen, war vermutlich nicht durch eine Veränderung in der C-Typ Inaktivierung verursacht, denn sowohl ein schnellerer ($10 \text{ mM } [K^+]_i$) als auch ein langsamerer Übergang ($145 \text{ mM } [Rb^+]_i$) in den C-Typ inaktivierten Zustand resultierte in einer Abschwächung der Verapamil-Affinität (Abb. 7A; Abb. 8A). Die Bestimmung der Verapamil-Affinität in Wildtyp Kanälen ist nicht nur durch den Übergang $O \rightarrow OB$ (Abb. 5) sondern auch durch den Übergang $OB \rightarrow IB$ und der Erholung aus dem

inaktivierten Zustand nach 30 s beeinflusst. Um den Einfluss der C-Typ Inaktivierung auf die Verapamil-Affinität zu vermeiden, wurde der mutierte Kanal H399T verwendet, bei dem die Übergänge zu IB und I vernachlässigbar sind. Die Beobachtungen in mutierten Kanälen zeigten, dass die Veränderung in der Verapamil Affinität geringer war als in Wildtyp Kanälen, jedoch immer noch vorhanden war. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass in Wildtyp Kanälen ein Teil der Veränderungen in der Verapamil-Affinität vermutlich auf den veränderten C-Typ inaktivierten Zustand zurückzuführen waren und ein anderer Teil tatsächlich aufgrund der intrazellulären Kationen zustande kam. Die Veränderung in der Verapamil-Affinität, verursacht durch eine Veränderung in der intrazellulären Kationenkonzentration, kann nicht auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen sein. In diesem Fall würde man davon ausgehen, dass bei geringen K^+ Konzentrationen die Bindung des Verapamils stärker sein müsste. Die Bindungsstelle für Verapamil liegt im inneren Vestibül, unterhalb des Selektivitätsfilters (DeCoursey, 1995; Rauer et al., 1996; Rauer et al. 1999), so dass die letzte Bindungsstelle für Kationen im Selektivitätsfilter (Position 4) und die Bindungsstelle für Verapamil benachbart sind. Während bei hohen Konzentrationen von K^+ es zu Abstoßungsreaktionen zwischen K^+ und dem positiv geladenem Verapamil kommen würde, müssten diese Abstoßungsreaktionen bei weniger K^+ schwächer werden, was eine bessere Bindung von Verapamil bedeuten würde. Aufgrund dessen können die elektrostatischen Wechselwirkungen ausgeschlossen werden. Dies legt nahe, dass die Veränderungen in der Verapamil-Affinität verursacht durch die Konzentration der Kationen durch die Bindungsstellen für Kationen im Selektivitätsfilter verursacht sein könnte (Zhou et al., 2003) und somit auf strukturelle Veränderungen zurückzuführen ist. Der Vergleich zwischen hohem K^+ und hohem Rb^+ zeigt, dass die Struktur im Bereich des Selektivitätsfilters sich kaum voneinander unterscheidet (Abb. 4A und B; Zhou et al., 2003). Die Verapamil-Affinität in mutierten H399T Kanälen ist in 145 mM $[Rb^+]_i$ ähnlich wie in 145 mM $[K^+]_i$ (Tab. 2). Die Ähnlichkeit zwischen der Verapamil-Affinität zeigt, dass sich die Struktur und somit auch die Bindungsstelle für Verapamil sich kaum unterscheiden zwischen hohem Rb^+ und hohem K^+ . Anders ist es jedoch bei geringen Konzentrationen von K^+ . Der Selektivitätsfilter ist nur gering besetzt und dadurch kommt es zu signifikanten Veränderungen in der Struktur (Abb 4C; Zhou et al., 2003). Die

Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass diese strukturelle Veränderung, verursacht durch 10 mM $[K^+]_i$, zu einer reduzierten Verapamil-Affinität führt. Verapamil reduziert die Ströme durch mutierte H399T Kanäle um einen Faktor von 3 schlechter als es in 145 mM $[K^+]_i$ der Fall war. Eine Reduzierung der Rb^+ Konzentration könnte eine ähnliche Strukturveränderung hervorrufen wie es in K^+ der Fall ist. Dies würde auch erklären, warum in mutierten H399T Kanälen in 10 mM $[K^+]_i$ und 10 mM $[Rb^+]_i$ eine fast identische Verapamil-Affinität ($\sim 5,5 \mu M$) besteht. Die Verapamil-Affinität deutet darauf hin, dass die Struktur im Bereich des Selektivitätsfilters bei den niedrigen Kationenkonzentrationen ähnlich, wenn nicht sogar identisch, aufgebaut ist. Daher komme ich zu dem Schluss, dass die intrazellulären Kationen die Verapamil Affinität in *hKv1.3* Kanälen durch die Besetzung der Kationen-Bindungsstelle im Selektivitätsfilter beeinflussen. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch in *hKv1.5* Kanälen mit Nifedipin gemacht (Lin et al., 2001). Der Effekt von Nifedipin war in hohen Rb^+ Konzentrationen etwa 2-mal schlechter als in hohen K^+ Konzentrationen. Diese Veränderung der Nifedipin-Affinität in *Kv1.5* Kanälen aufgrund von Rb^+ war mit meinen Daten in *Kv1.3* Kanälen vergleichbar, da ich auch einen veränderten Effekt von Verapamil durch Rb^+ beobachten konnte. Lin und Kollegen (2001) haben daraus geschlossen, dass die Bindungsstelle der Kationen innerhalb der Kanalpore in der Nähe der Bindungsstelle für Nifedipin sein könnte. Dadurch könnten die Kationen die Affinität von Nifedipin verändern. Die Schlussfolgerung, die ich aus meinen Ergebnissen gezogen habe, entsprechen den Folgerungen von Lin und Kollegen (2001).

5.2 Die Spannungsabhängigkeit der Verapamil Rückreaktion (off-rate)

Extrazelluläres K^+ kann, bei hyperpolarisierenden Potentialen, intrazelluläres TEA^+ von seiner Bindungsstelle verdrängen, und zwar durch einen spannungsabhängigen Eintritt der Kaliumionen in den Kanal (Armstrong, 1971). Dieser Mechanismus könnte auch eine Erklärung für die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion liefern. Für diese Möglichkeit wurden mithilfe von hohem $[Rb^+]_e$ Konditionen geschaffen, wo die Schließung des Kanals, verglichen zu den Kontrollbedingungen (hohes $[K^+]_e$), verlangsamt wurde. Dieser Vorgang

fürte zu einer längeren Dauer im offenen Zustand des Kanals bei negativen Potentialen um einen Faktor von ~5. Dies war auch schon in einer früheren Veröffentlichung berichtet worden (Cahalan et al., 1985). Die Rückreaktion von Verapamil war in hohem $[Rb^+]_e$ auch um ein Faktor von ~2 verlangsamt verglichen zu denen unter Kontrollbedingungen (hohes $[K^+]_e$). Dieses Ergebnis deutet zum einen darauf hin, dass die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion nicht im Wesentlichen durch die positive Ladung des Verapamils, welches das elektrische Feld der Membran spürt und daraufhin seine Bindungsstelle verlässt, verursacht wird und zum anderen, dass die Schließung des Kanals eine wesentliche Rolle in der Verapamil-Rückreaktion spielt. Allerdings kann bis hierhin nicht ausgeschlossen werden, dass der spannungsabhängige Eintritt von K^+ bzw. Rb^+ in den Kanal das Verapamil von seiner Bindungsstelle verdrängen könnte. Um zu beweisen, ob der spannungsabhängige Eintritt von Kationen für die Verapamil-Rückreaktion verantwortlich ist, wurden die Messungen in hohem $[Na^+]_e$ wiederholt. Dabei zeigte sich, dass die Verapamil Rückreaktionskonstante bei dem hyperpolarisierenden Potential -160 mV nahezu 10-fach langsamer in hohem $[Na^+]_e$ mit $[K^+]_e = 4,5$ mM verglichen zu hohem $[K^+]_e$ mit $[K^+]_e = 160$ mM war. Die Beobachtungen in hohem $[Na^+]_e$ könnten auf einen spannungsabhängigen Eintritt von K^+ in den Kanal hinweisen, welches das Verapamil von seiner Bindungsstelle verdrängt. Die langsame Rückreaktionskonstante in 4,5 mM $[K^+]_e$ könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die wenigen Kaliumionen der spannungsabhängige Eintritt von K^+ limitiert wurde. Jedoch kann der spannungsabhängige Eintritt der Kationen nicht unbedingt erklären, warum beispielsweise in Rb^+ die Zeitkonstante von $OB \rightarrow O$ um ein ~5-faches langsamer war als in K^+ , jedoch die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion mehr oder weniger gleich blieb. Eine alternative Interpretation zu den Ergebnissen liefert der spannungsabhängige Schließvorgang der Kanäle, die für die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion verantwortlich sein könnte. Aufgrund einiger Beobachtungen bevorzuge ich die Zustandsabhängigkeit der Rückreaktion des Verapamils:

- (1) Die Ähnlichkeit zwischen der Spannungsabhängigkeit der Ratenkonstante für die Deaktivierung und der Ratenkonstante für die Verapamil-Rückreaktion unter verschiedenen Bedingungen

(2) $[Rb^+]_e$ verlangsamt sowohl die Deaktivierung als auch die Verapamil-Rückreaktion

Die Ergebnisse könnten so interpretiert werden, dass die Spannungsabhängigkeit für die Verapamil-Rückreaktion vermutlich auf die Schließung des Kanals zurückzuführen ist, obwohl der spannungsabhängige Eintritt von K^+ in den Kanal nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Die Experimente zur Untersuchung der Verapamil-Rückreaktion zeigten unter den verschiedensten Bedingungen (K^+ , Rb^+ , Na^+) immer einen Hook. Im Hook verlässt Verapamil zunächst seine Bindungsstelle ($OB \rightarrow O$) und die Kanäle befinden sich dann in einem offenen Zustand, der vermutlich nicht von Verapamil blockiert wird, und die Kanäle gehen dann erst vom offenen in den geschlossenen Zustand über ($O \rightarrow C$). Diese Beobachtung lässt eine Interpretation zu, die auf zwei verschiedene offene Konformationen hindeutet, die die Kanäle bei hyperpolarisierenden Potentialen nach einer Depolarisation eingehen, bevor sie endgültig in den geschlossenen Zustand übergehen können. Dann wäre ein zweiter offener Zustand vorhanden, der eine geringere Affinität zu Verapamil besitzt. Deswegen wurden die kinetischen Eigenschaften der Schließung des Kanals untersucht, wobei versucht wurde, kinetische Hinweise für einen weiteren offenen Zustand in *hKv1.3* Kanäle zu erhalten.

5.3 Beobachtung des zweiten offenen Zustandes mithilfe der Tail-Ströme

Die Experimente in Abbildung 18 weisen auf einen zweiten offenen Zustand in *hKv1.3* Kanälen hin. Eine längere Depolarisation verlangsamt den zeitlichen Verlauf der Deaktivierung bei den hyperpolarisierenden Potentialen. Durch die Tatsache, dass zwischen dem Deaktivierungs-Zeitverlauf und der Dauer bei den vorangehenden depolarisierenden Pulsen eine Abhängigkeit besteht, komme ich zu dem Schluss, dass die Wildtyp *hKv1.3* Kanäle mindestens zwei verschiedene Konformationsänderungen durchlaufen bis die Kanäle letztendlich in den geschlossenen Zustand übergehen (Abb. 19). Wenn davon ausgegangen werden kann, dass die Kanäle nach 15 ms Depolarisation alle in O_1 sind, dann kann daraus geschlossen werden, dass der Übergang von $O_1 \rightarrow C$ in der folgenden Hyperpolarisation bei -160 mV 18 ms dauert. Durch eine Simulation des Tail-

Stromes bei -160 mV konnte ich feststellen, dass sich nach 15 ms Depolarisation tatsächlich alle Kanäle in O_I befinden. Um festzustellen wie viele der Kanäle sich nach 500 ms Depolarisation in O_{II} befinden, wurde der Tail-Strom bei -160 mV simuliert. Mithilfe der Simulation konnte ich herausfinden, dass etwa 25 % der Kanäle nach 500 ms Depolarisation in O_{II} sind. Anscheinend dauert es sehr lange bis die Kanäle während einer Depolarisation in den zweiten offenen Zustand O_{II} übergehen können. Der Übergang von $O_{II} \rightarrow O_I$ erfolgte mit einer Zeitkonstante von ~ 50 ms bei -160 mV und war damit fast 3-mal langsamer als der Übergang von $O_I \rightarrow C$.

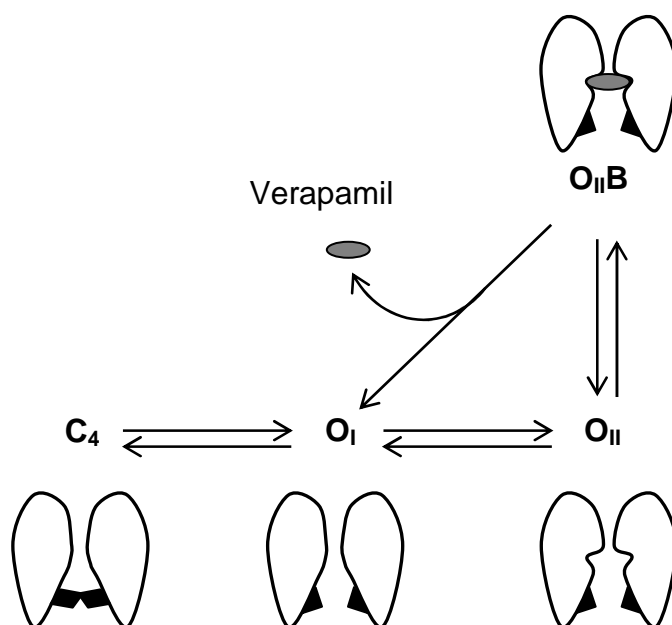


Abbildung 19: Vereinfachtes Schema der Übergänge zwischen den einzelnen Kanalzuständen im $hKv1.3$ Kanal durch De- und Hyperpolarisation. Die vereinfachten Cartoons sollen die möglichen Konformationsänderungen des Kanals verdeutlichen. C_4 ist der letzte geschlossene Zustand, O_I und O_{II} sind die offenen, leitenden Zustände und $O_{II}B$ ist der offen-blockierte Zustand. Der inaktivierte Zustand ist hier nicht gezeigt.

Wie die Schließung des Kanals selbst jetzt die Verapamil-Rückreaktion beeinflussen könnte, mit oder ohne einem möglichen, spannungsabhängigen K^+ Eintrittsmechanismus wie oben beschrieben, ist in Abbildung 19 gezeigt. Die erste Konformationsänderung würde das Verapamil aus seiner Bindungsstelle rausdrücken, jedoch immer noch erlauben, dass Ionen durch den Kanal passieren ($O_{II}B \rightarrow O_I$). Die zweite Konformationsänderung würde dann letztendlich den Kanal schließen ($O_I \rightarrow C$). Die Ergebnisse weisen auf einen zweiten offenen

Zustand in den Kanälen hin, der möglicherweise nicht von Verapamil blockiert werden kann. In diesem Fall hätte der erste offene Zustand O_I eine geringe Affinität zu Verapamil, wohingegen der zweite offene Zustand O_{II} eine hohe Verapamil Affinität hätte. Rb^+ könnte den zweiten offenen Zustand stabilisieren und würde somit einen Übergang von $O_{II} \rightarrow O_I$ und dem anschließenden Übergang von $O_I \rightarrow C$ viel langsamer machen als in K^+ . Diese Interpretation der Ergebnisse könnte auch erklären, warum die Deaktivierung in hohem $[Rb^+]_e$ um einen Faktor von ~ 5 verglichen zu den Kontrollbedingungen in hohem $[K^+]_e$ verringert wurde.

5.4 Vergleich mit anderen Kanälen

In *hKv1.5* Kanal, einem anderen spannungsabhängigen K^+ Kanal, wurden ebenfalls zwei offene Zustände postuliert (Rich *et al.*, 1998). Die Schließung des Kanals (Deaktivierung) war bei Hyperpolarisation langsamer je länger der depolarisierende Puls war. Meine Experimente mit *hKv1.3* Kanäle wurden mit ähnlichen Pulsprotokollen wie die von den Experimenten von Rich und Kollegen (1998) durchgeführt. Auch ich habe beobachtet, dass eine Verlängerung des depolarisierenden Pulses in einer Verlangsamung in dem zeitlichen Verlauf der Deaktivierung resultierte, verglichen zu kurzen depolarisierenden Phasen, bei dem der Kanal dann schneller schließt. Auch in anderen K^+ Kanäle wurden schon zwei oder mehrere offene Zustände beschrieben, wie z.B. für die HCN Kanäle (Männikkö *et al.*, 2005; Elinder *et al.*, 2006) und die MaxiK Kanäle (Benzinger *et al.*, 2006). In beiden Kanälen wurden mehr als ein offener Zustand hauptsächlich aufgrund von kinetischen Daten postuliert, ähnlich zu den Messungen in dieser Arbeit.

Im homomeren KCNQ1 Kanälen wurden mindestens zwei offene Zustände beobachtet (Pusch *et al.*, 2001). Die Autoren haben den Na^+ Block in diesen Kanälen gemessen. Sie haben herausgefunden, dass nach kurzen depolarisierenden Pulsen (50 ms) der Block mit Na^+ geringer war als nach längeren depolarisierenden Pulsen (200 ms), bei denen die Ströme durch homomere KCNQ1 Kanäle komplett blockiert wurden. Die Autoren schlossen daraus, dass in homomeren KCNQ1 Kanälen der Na^+ Block einen Beweis für die Existenz von mindestens zwei offenen Zuständen mit unterschiedlichen Na^+

Affinitäten darstellt. Der erste offene Zustand hätte eine geringe Affinität zu Na^+ während der zweite offene Zustand eine hohe Na^+ Affinität hätte. In Abwesenheit von Na^+ zeigten die offenen Zustände eine ähnliche Leitfähigkeit, d.h. der Übergang zwischen den offenen Zuständen hatte keine Veränderung in dem Strom erzeugt. Die Verapamil Affinität in *hKv1.3* Kanälen könnte so ähnlich verlaufen wie die Na^+ Affinität in homomeren KCNQ1 Kanälen. In *hKv1.3* Kanälen würde der erste offene Zustand eine geringe Verapamil Affinität zeigen während der zweite offene Zustand eine hohe Verapamil Affinität aufweisen würde. Auch was die Leitfähigkeit der zwei offenen Zustände in *hKv1.3* Kanälen angeht, müsste es so ähnlich sein wie in homomeren KCNQ1 Kanälen. Die Zustände O_I und O_{II} in *hKv1.3* Kanälen müssten eine ähnliche Leitfähigkeit besitzen, denn bei kurzer (15 ms) Depolarisation erreichte die Stromamplitude fast denselben Wert wie bei langer (500 ms) Depolarisation.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde in Kv1.3 Kanälen zum einen der Effekt der intrazellulären Kationenkonzentration auf die Verapamil-Affinität untersucht und zum anderen die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion. Ich komme zu den folgenden Schlussfolgerungen:

1) Die Besetzung des Selektivitätsfilters durch Kationen verändert die Struktur in diesem Bereich und korreliert mit der Verapamil-Affinität:

- a) Eine Verringerung der intrazellulären Kationenkonzentration führte zu einem reduzierten Effekt von Verapamil.
- b) In hohem $[Rb^+]_i$ wird die Affinität von Verapamil nur minimal verändert verglichen mit hohem $[K^+]_i$.
- c) In den Wildtyp *hKv1.3* Kanälen wurde der Übergang in den C-Typ inaktivierten Zustand durch die Kationen verändert. Zum einen wurde die Inaktivierung schneller ($145 \text{ mM } [K^+]_i \rightarrow 10 \text{ mM } [K^+]_i$) und zum anderen langsamer ($145 \text{ mM } [K^+]_i \rightarrow 145 \text{ mM } [Rb^+]_i$). In beiden Fällen wurde allerdings die Verapamil-Affinität schlechter. Dies lässt vermuten, dass die Veränderung der Verapamil-Affinität in Wildtyp Kanälen nicht unbedingt auf den Übergang in die C-Typ Inaktivierung zurückzuführen ist. Versuche mit mutierten H399T Kanälen, die kaum C-Typ Inaktivierung zeigen, bestätigten diese Vermutung.

2) Die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion könnte auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. In der hier vorliegenden Arbeit wollte ich klären, wie das Verapamil seine Bindungsstelle verlässt.

- a) Durch die Versuche in hohem $[Rb^+]_e$ komme ich zu dem Schluss, dass Verapamil nicht aufgrund des elektrischen Feldes der Membran seine Bindungsstelle verlässt, sondern aufgrund des Kanalzustandes.
- b) Die Versuche mit unterschiedlichen extrazellulären Kaliumkonzentrationen zeigten, dass der spannungsabhängige Eintritt von Kationen in die Kanäle für die Spannungsabhängigkeit der Verapamil-Rückreaktion verantwortlich sein könnte.
- c) Die Versuche in hohem $[Rb^+]_e$ deuten darauf hin, dass Verapamil seine Bindungsstelle verlässt, weil der Kanal sich schließt. Diese Hypothese

impliziert, dass der Kanal zwei offene Zustände hat mit unterschiedlichen Verapamil-Affinitäten. Versuche mit kurzen und langen Depolarisationen lieferten Hinweise für solch einen zweiten offenen Zustand des Kanals.

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Verapamil-Affinität indirekt von Kationen beeinflusst wird, indem bei geringen Kationenkonzentrationen der Selektivitätsfilter nur gering besetzt ist und somit der Bereich des Selektivitätsfilters sich verändert. Darüber hinaus existieren zwei offene Zustände in Kv1.3 Kanälen, die eine unterschiedliche Affinität zu Verapamil besitzen. Die vorliegende Arbeit hilft in dem Verständnis, wie Verapamil die Ströme durch Kv1.3 Kanäle blockiert und wie die Verapamil-Rückreaktion verläuft und könnte Auswirkungen auf die zukünftige Entwicklung wirksamer Kv1.3 Kanalblocker haben.

7. Literaturverzeichnis

- Armstrong C.M. (1971). Interaction of Tetraethylammonium Ion Derivates with the Potassium Channels of Giant Axons. *J. Gen. Physiol.* **58**: 413-437.
- Atkinson M.A., MacLaren N.K. (1994). The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *New Eng. J. Med.* **331**: 1428-1436.
- Beeton C., Wulff H., Barbaria J., Clot-Faybesse O., Pennington M., Bernard D., Cahalan M.D., Chandy K.G., Béraud E. (2001). Selective blockade of T lymphocyte K⁺ channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 13942-13947.
- Benzinger G.R., Xia X.-M., Lingle C.J. (2006). Direct observation of a Preinactivated, Open State in BK Channels with β 2 Subunits. *J. Gen. Physiol.* **127**: 119-131.
- Cahalan M.D., Chandy K.G., DeCoursey T.E., Gupta S. (1985). A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *J. Physiol.* **358**: 197-237.
- Chandy K.G., DeCoursey T.E., Cahalan M.D., McLaughlin C., Gupta S. (1984). Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **160**: 369-385.
- DeCoursey T.E., Chandy K.G., Gupta S, Cahalan M.D. (1984). Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature.* **307**: 465-468.
- DeCoursey T.E. (1990). State-dependent inactivation of K⁺ currents in rat type II alveolar epithelial cells. *J. Gen. Physiol.* **95**: 617-646.
- DeCoursey T.E. (1995). Mechanism of K⁺ channel block by verapamil and related compounds in rat alveolar epithelial cells. *J. Gen. Physiol.* **106**: 745-779.

- Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. (1998) The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science*. **280**: 69-77.
- Dreker T., Grissmer S. (2005). Investigation of the Phenylalkylamine Binding Site in *hKv1.3* (H399T), a Mutant with a Reduced C-type Inactivated State. *Mol. Pharmacol.* **68**: 966-973.
- Elinder F., Männikkö R., Pandey S., Larsson H.P. (2006). Mode shifts in the voltage gating of the mouse and human HCN2 and HCN4 channels. *J. Physiol.* **575**: 417-431.
- Fanger C.M., Ghanshani S., Logsdon N.J., Rauer H., Kalman K., Zhou J., Beckingham K., Chandy K.G., Cahalan M.D., Aiyar J. (1999). Calmodulin Mediates Calcium-dependent Activation of the Intermediate Conductance K_{Ca} Channel, *IKCa1*. *J. Biol. Chem.* **274**: 5746-5754.
- Fanger C.M., Rauer H., Neben A.L., Miller M.J., Rauer H., Wulff H., Campos Rosa J., Ganellin C.R., Chandy K.G., Cahalan M.D. (2001). Calcium-activated Potassium Channels Sustain Calcium Signaling in T Lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **276**: 12249-12256.
- Garcia-Calvo M., Leonard R.J., Novick J., Stevens S.P., Schmalhofer W., Kaczorowski G.J., Garcia M.L. (1993). Purification, Characterization, and Biosynthesis of Margatoxin, a Component of *Centruroides margaritatus* Venom That Selectively Inhibits Voltage-dependent Potassium channels. *J. Biol. Chem.* **268**: 18866-18874.
- Gouaux E., MacKinnon R. (2005). Principles of Selective Ion Transport in Channels and Pumps. *Science*. **310**: 1461-1465.
- Grissmer S., Dethlefs B., Wasmuth J.J., Goldin A.L., Gutman G.A., Cahalan M.D., Chandy K.G. (1990). Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K⁺ channel gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9411-9415.

- Grissmer S., Nguyen A.N., Aiyar J., Hanson D.C., Mather R.J., Gutman A.G., Karmiowicz M.J., Auperin D.D., Chandy K.G. (1994). Pharmacological Characterization of Five Cloned Voltage-Gated K⁺ Channels, Types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, Stably Expressed in Mammalian Cell Lines. *Mol. Pharmacol.* **45**: 1227-1234.
- Gross A., Abramson T., MacKinnon R. (1994). Transfer of the Scorpion Toxin Receptor to an Insensitive Potassium Channel. *Neuron.* **13**: 961-966
- Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**: 85-100.
- Hanson D.C., Nguyen A., Mather R.J., Rauer H., Koch K., Burgess L.E., Rizzi J.P., Donovan C.B., Bruns M.J., Canniff P.C., Cunningham A.C., Verdries K.A., Mena E., Kath J.C., Gutman G.A., Cahalan M.D., Grissmer S., Chandy K.G. (1999). UK-78,282, a novel piperidine compound that potently blocks the Kv1.3 voltage-gated potassium channel and inhibits human T cell activation. *Br. J. Pharmacol.* **126**: 1707-1716.
- Hille B. (2001). Ion Channels of Excitable Membranes, Third Edition, Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, USA.
- Jiang Y., Ruta V., Chen J., Lee A., MacKinnon R. (2003). The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature.* **423**: 42-48.
- Kalman K., Pennington M.W., Lanigan M.D., Nguyen A., Rauer H., Mahnir V., Paschetto K., Kem W.R., Grissmer S., Gutman G.A., Christian E.P., Cahalan M.D., Norton R.S., Chandy K.G. (1998). ShK-Dap²², a Potent Kv1.3-specific Immunosuppressive Polypeptide. *J. Biol. Chem.* **273**: 32697-32707.
- Lin S., Wang Z., Fedida D. (2001). Influence of permeating ions on Kv1.5 channel block by nifedipine. *Am. J. Physiol.-Heart C.* **280**: H1160-H1172.

- Long. S.B., Campbell E.B., MacKinnon R. (2005). Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling. *Science*. **309**: 903-908.
- López-Barneo J., Hoshi T., Heinemann S.H., Aldrich R.W. (1993). Effects of Extracellular Cations and Mutations in the Pore Region on C-Type Inactivation of *Shaker* Potassium Channels. *Receptors and Channels* **1**: 61-71.
- Männikkö R., Pandey S., Larsson H.P., Elinder F. (2005). Hysteresis in the Voltage Dependence of HCN Channels: Conversion between Two Modes Affects Pacemaker Properties. *J. Gen. Physiol.* **125**: 305-326.
- Morais-Cabral J.H., Zhou Y., MacKinnon R. (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature*. **414**: 37-42.
- Nguyen A., Kath J.C., Hanson D.C., Biggers M.S., Canniff P.C., Donovan C.B., Mather R.J., Bruns M.J., Rauer H., Aiyar J., Lepple-Wienhues A., Gutman G.A., Grissmer S., Cahalan M.D., Chandy K.G. (1996). Novel Nonpeptide Agents Potently Block the C-Type Inactivated Conformation of Kv1.3 and Suppress T cell Activation. *Mol. Pharmacol.* **50**: 1672-1679.
- Perozo E., Santacruz-Tolosa L., Stefani E., Bezanilla F., Papazian D.M. (1994). S4 Mutations Alter Gating Currents of Shaker K Channels. *Biophys. J.* **66**: 345-354.
- Price M., Lee S.C., Deutsch C. (1989). Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**: 10171-10175.
- Pusch M., Ferrera L., Friedrich T. (2001). Two open states and rate-limiting gating steps revealed by intracellular Na⁺ block of human KCNQ1 and KCNQ1/KCNE1 K⁺ channels. *J. Physiol.* **533.1**: 135-144.
- Rauer H., Grissmer S. (1996). Evidence for an internal phenylalkylamine action on the voltage-gated potassium channel Kv1.3. *Mol. Pharmacol.* **50**: 1625-1634.

- Rauer H., Grissmer S. (1999). The effect of deep pore mutations on the action of phenylalkylamines on the Kv1.3 potassium channel. *Br. J. Pharmacol.* **127**: 1065-1074.
- Rich T.C., Snyders D.J. (1998). Evidence for Multiple Open and Inactivated States of the *hKv1.5* Delayed Rectifier. *Biophys. J.* **75**: 183-195.
- Röbe R.J., Grissmer S. (2000). Block of the lymphocyte K⁺ channel *mKv1.3* by the phenylalkylamine verapamil: kinetic aspects of block and disruption of accumulation of block by a single point mutation. *Br. J. Pharmacol.* **131**: 1275-1284.
- Schmitz A., Sankaranarayanan A., Azam P., Schmidt-Lassen K., Homerick D., Hansel W., Wulff H. (2005). Design of PAP-1, a selective small molecule Kv1.3 blocker, for the suppression of effector memory T cells in autoimmune diseases. *Mol. Pharmacol.* **68**: 1254-1270.
- Tombola F., Pathak M.M., Isacoff E.Y. (2005). How Far Will You Go to Sense Voltage? *Neuron.* **48**: 719-725.
- Vennekamp J., Wulff H., Beeton C., Calabresi P.A., Grissmer S., Hänsel W., Chandy K.G. (2004). Kv1.3 blocking 5-phenylalkoxypsoralens: a new class of immunomodulators. *Mol. Pharmacol.* **65**: 1364-1373.
- Wulff H., Calabresi P.A., Allie R., Yun S., Pennington M., Beeton C., Chandy K.G. (2003). The voltage-gated Kv1.3 K⁺ channel in effector memory T cells as new target for MS. *J. Clin. Invest.* **111**: 1703-1713.
- Yifrach O., MacKinnon R. (2002). Energetics of Pore Opening in a Voltage-Gated K⁺ Channel. *Cell.* **111**: 231-239.
- Zhou Y., MacKinnon R. (2003). The Occupancy of Ions in the K⁺ Selectivity filter: Charge Balance and Coupling of Ion Binding to a Protein Conformational Change Underlie High Conduction Rates. *J. Mol. Biol.* **333**: 965-975.

Zhou Y., MacKinnon R. (2004). Ion Binding Affinity in the Cavity of the KcsA Potassium Channel. *Biochem.* **43**: 4978-4982.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stephan Grissmer für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Dabei möchte ich mich besonders bedanken für seine unermüdliche Beantwortung aller Fragen, für seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und für die gute Arbeitsatmosphäre.

Dem Leiter der Abteilung für Angewandte Physiologie, Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Lehmann-Horn möchte ich für seine Unterstützung, sowie die Unterstützung durch seine Mitarbeiter danken.

Mein Dank gilt auch der Firma 4SC AG (Martinsried), die zum größten Teil für die Personal- und Materialkosten dieser Arbeit aufgekommen ist.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Stephan Grissmer möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit, die angenehme Atmosphäre und für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bedanken. Dabei möchte ich Frau Sylvia Prütting für ihre ritterliche Hilfsbereitschaft und für die ergiebigen und kritischen Diskussionen besonders hervorheben. Frau Katharina Ruff danke ich für ihre Hilfe bei molekularbiologischen Arbeiten und die Versorgung der Zellen, und für ihre freundliche Natur. Frau Dr. Eva Frei, Herrn Dr. Tobias Dreker, Frau Dr. Aura (aka Georgeta) Teodorescu, Herrn Dr. Oliver Wittekindt, Frau Jessica Kistner und Frau Azadeh Nikouee Ghadikolaei danke ich für ihre Unterstützung, ihre Diskussionsbereitschaft und für die gute Zusammenarbeit.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilungen für Angewandte und Allgemeine Physiologie, die mir bei der Durchführung meiner Arbeit geholfen haben, möchte ich mich natürlich auch bedanken, allen voran Herrn Boris Holzherr für seine Hilfestellung bei mathematischen Fragen.

Ich danke all meinen Freunden für ihre mentale Unterstützung, für ihre freundliche Ablenkung vom Arbeitsalltag, und für ein ständig offenes Ohr.

Am wichtigsten möchte ich mich besonders bei meinen Eltern Nevin und Yakup Kuras bedanken, die mir eine universitäre Ausbildung ermöglicht haben und die mich zu jeder Zeit unterstützen, und bei meinem Bruder Engin Kuras, der in all meinen Wegen eine große Stütze ist und mir stets mit Rat und Tat zur Seite steht.