

Universität Ulm
Institut für Angewandte Physiologie
Prof. Dr. Birgit Liss

Effekt von MTS-Reagenzien auf humane
spannungsabhängige *hKv1.3* Wildtyp,
hKv1.3_V417C mutierte und *hKv1.3_V417C-*
H399T mutierte Kaliumkanäle: Implikationen für
den C-Typ inaktivierten Zustand

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von
Sonja Ines Schmid

Nürtingen

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Grissmer

2. Berichterstatter: PD Dr. K. Föhr

Tag der Promotion: 04.07.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis	iii
1. Einleitung.....	- 1 -
1.1 Der spannungsabhängige Kv1.3 Kaliumkanal	- 1 -
1.1.1 Aufbau und Struktur von Kv1.3.....	- 1 -
1.1.2 Kanalzustände	- 3 -
1.2 Vorkommen und Bedeutung von Kv1.3	- 6 -
1.2.1 Vorkommen von Kv1.3 Untereinheiten	- 6 -
1.2.2 Physiologische Rolle des <i>hKv1.3</i> Kanals auf T-Lymphozyten	- 7 -
1.2.3 MTS-Regenzien.....	- 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 -
3.2.4 Präparation der Zellen für die elektrophysiologischen Messungen..	- 14 -
3.3 Elektrophysiologie	- 15 -
3.3.1 Lösungen und Reagenzien.....	- 15 -
3.3.1 Aufbau der Patch-Clamp Apparatur.....	- 15 -
3.3.2 Versuchsdurchführung.....	- 16 -
3.3.3 Messverfahren	- 16 -
3.3.4 Auswertung der Daten.....	- 17 -
4. Ergebnisse	- 18 -
4.1 Einfluss von extrazellulär appliziertem MTSEA	- 18 -
4.1.1 <i>hKv1.3</i> Wildtyp und <i>hKv1.3_V417C</i>	- 18 -

4.1.2 Effekt von MTSEA auf <i>hKv1.3</i> Wildtyp und <i>hKv1.3_V417C</i> mutierte Kanäle im geschlossenen Zustand.....	- 21 -
4.1.3 Effekt von extrazellulär appliziertem MTSEA auf mutierte <i>hKv1.3_V417C</i> und mutierte <i>hKv1.3_H399T-V417C</i> Kanäle im offenen Zustand.....	- 25 -
4.1.4 Effekt von MTSEA auf den mutierten <i>hKv1.3_V417C</i> Kanal im inaktivierten Zustand	- 29 -
4.2 Inhibition der durch MTSEA hervorgerufenen Stromabnahme an <i>hKv1.3_V417C</i> mutierten Kanälen durch Applikation von Verapamil	- 33 -
4.3 Effekt von intrazellulär verabreichten MTS-Reagenzien auf den Strom durch mutierte <i>hKv1.3_V417C</i> Kanäle	- 35 -
4.3.1 Effekt von intrazellulär appliziertem MTSEA auf mutierte <i>hKv1.3_V417C</i> Kanäle	- 35 -
4.3.2 Effekt von intrazellulär appliziertem MTSET und MTSES auf <i>hKv1.3</i> Wildtyp und <i>hKv1.3_V417C</i> mutierte Kanäle.....	- 38 -
5. Diskussion.....	- 42 -
5.1 MTS-Reagenzien wirken von der intrazellulären Seite des <i>hKv1.3_V417C</i> Kanals	- 42 -
5.2 MTS-Reagenzien können den geschlossenen Zustand des <i>hKv1.3_V417C</i> mutierten Kanals nicht modifizieren.....	- 45 -
5.3. MTS-Reagenzien können Kanäle, die sich im offenen oder C-Typ inaktivierten Zustand befinden, modifizieren	- 46 -
5.4 Verapamil verhindert die durch MTSEA hervorgerufenen Modifikation der <i>hKv1.3_V417C</i> Kanäle	- 47 -
5.5. Interaktionsmodell von MTS-Reagenzien mit dem Cystein in <i>hKv1.3_V417C</i> Kanälen	- 48 -
6. Zusammenfassung.....	- 51 -
7. Literaturverzeichnis	- 53 -
Danksagung	- 58 -

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	HP	Haltepotential
°C	Grad Celsius	I_{peak}	Spitzenstrom
μg	Mikrogramm	K	Kalium
μl	Mikroliter	K^+	Kaliumion
2xYT	Vollmedium	Kat.-Nr.	Katalognummer
A	Ampère	KCl	Kaliumchlorid
ca.	circa	KF	Kaliumfluorid
Ca^{2+}	Calciumion		(intrazelluläre Lösung)
CaCl_2	Calciumchlorid	KOH	Kaliumhydroxid
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (Chloridkanal)	Kv	spannungsabhängiger Kaliumkanal
Cl^-	Chloridion	l	Liter
CO_2	Kohlenstoffdioxid	LB	Flüssignährmedium
D	Aspartat	$\text{LB}^{+\text{Amp}}$	Flüssignährmedium mit Ampicillin
E.coli	Escherichia coli	M	mol/l
EGTA	Ethylenglycoltetra- essigsäure	m	Milli-
G	Glycin	Mg^{2+}	Magnesiumion
g	Gramm	MgCl_2	Magnesiumchlorid
GFP	Green Fluorescent Protein	MgSO_4	Magnesiumsulfat
<i>h</i>	Mensch-	min	Minute
H_2O	Wasser	ml	Milliliter
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)- piperazin-1- ethansulfonsäure*Acide	MTSEA	2-Aminoethyl Methanthiosulfonat
HCN	Hyperpolarization- activated, cyclic nucleotide-gated channel	MTSES	Natrium (2- Sulfonatoethyl)methan- thiosulfonat
		MTSET	[2- (Trimethylammonium)et hyl]methanthiosulfonat Bromid

n	Anzahl an Versuchen	τ_m	Zeitkonstante für die
n	Nano-		durch MTS-Reagenzien
Na^+	Natriumion		verursachte
NaCl	Natriumchlorid		Stromabnahme
NaOH	Natriumhydroxid	UpM	Umdrehungen pro
Na-Ri	Natrium-Ringer-Lösung		Minute
	(extrazelluläre Lösung)	v	Volumenanteil
ng	Nanogramm	V	Volt
p	Pico-	VP	Verapamil
pdb	Protein Data Bank	Y	Tyrosin
PBS	Phosphat-gepufferte	wt	Wildtyp
	Salzlösung	z. B.	zum Beispiel
s	Sekunde		
τ_h	Zeitkonstante für die		
	Inaktivierung		

1. Einleitung

Zellen sind von einer Fettschicht, der Doppellipidschicht, umgeben. Somit können sie sich von der äußeren Umgebung sowie von anderen Zellen abgrenzen. Allerdings können die meisten polaren, wasserlöslichen Substanzen, wie z.B. Ionen, diese Zellmembran nicht überwinden. Aus diesem Grund befinden sich in der Zellmembran Proteine, die den Transport dieser Substanzen gewährleisten, um so die Ernährung der Zelle sowie den Abtransport von Abfallprodukten sicherzustellen. Einige dieser Proteine besitzen enge, hochselektive Poren, die meist nur für bestimmte Ionen permeabel sind, wie z. B. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , und ermöglichen den Transport von Ionen über die Zellmembran. Der Ionentransport ist dabei einerseits wichtig für ein ständig gleichbleibendes Milieu in der Zelle (Osmolarität) sowie auch für die Erregung von Nerven- und Muskelzellen und die Weiterleitung eines Aktionspotentials beispielsweise am Herzen. Fehlfunktionen in einzelnen Ionenkanälen können Krankheiten verursachen. So ist zum Beispiel der mutierte, spannungsabhängige *KCNQ1* Kaliumkanal die Ursache für das Long-QT-Syndrom (Delisle et al., 2004) und Mutationen im CFTR Chloridkanal führen zu Mukoviszidose (Riordan et al., 1989).

Um spezifische Therapien für die durch diese mutierten Kanäle hervorgerufenen Krankheiten zu finden, ist es wichtig mehr über die Funktion und den Aufbau des jeweiligen Kanals zu wissen, um im Anschluss wirksame Medikamente zu entwickeln. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der *hKv1.3* Kaliumkanal, der bei der Aktivierung von T-Lymphozyten eine wichtige Rolle spielt, bzw. zwei Mutanten dieses Kanals näher untersucht.

1.1 Der spannungsabhängige Kv1.3 Kaliumkanal

1.1.1 Aufbau und Struktur von Kv1.3

Der spannungsabhängige Kv1.3 Kaliumkanal gehört zur Familie der *Shaker*-verwandten Kaliumkanäle (Grissmer et al., 1990).

Erste Modelle zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Kanals wurden aus elektrophysiologischen Messungen abgeleitet. Vor einigen Jahren wurde dann

ein Kanalmodell basierend auf Kristallisationsdaten für den Kv1.2 Kanal publiziert (Long et al., 2005). Dieses Modell kann auch als Modell für den Kv1.3 Kanal benutzt werden, da beide Kanäle phylogenetisch verwandt sind (Gutman et al., 2003) und daher auch Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz aufweisen.

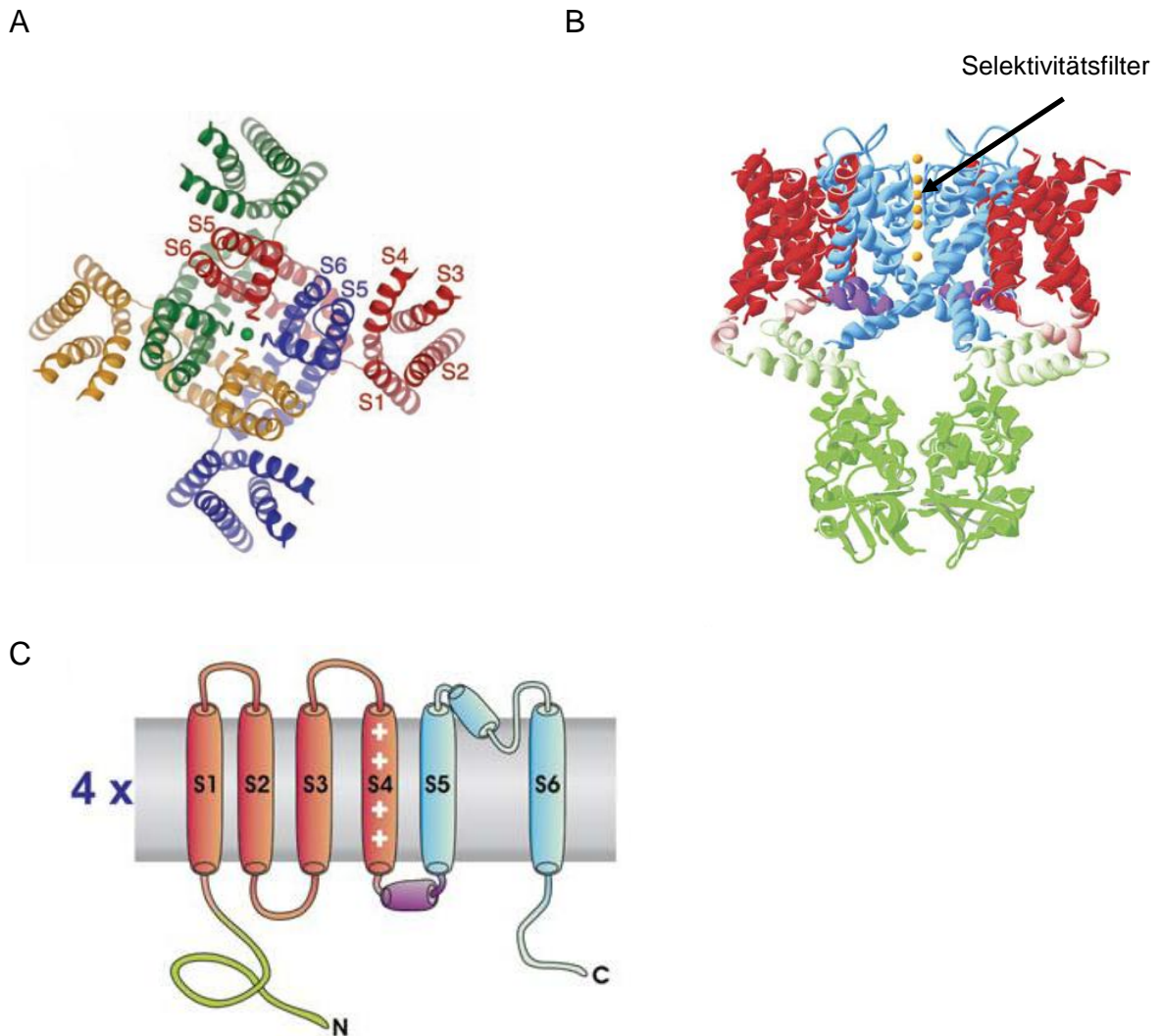


Abbildung 1: A, Darstellung eines Modells der vier Kanaluntereinheiten des Kv1.2 Kanals (jede Untereinheit hat ihre eigene Farbe) von der extrazellulären Seite aus gesehen. Die Transmembranhelices S1-S6 sind für eine Untereinheit (rot) dargestellt (Long et al. 2005). B, Darstellung des Kv1.2 Kanals von der Seite aus gesehen. Die extrazelluläre Seite zeigt nach oben, die intrazelluläre Seite zeigt nach unten. Gelb dargestellt sind Kaliumionen, beim Durchtritt durch den Selektivitätsfilter. C, Schematische Darstellung einer Untereinheit des Kv1.2 Kanals. Rot dargestellt sind die Spannungssensordomänen S1-S4, violett der S4-S5 Linker und blau die Porendomäne bestehend aus S5 und S6. (Tombola et al., 2005)

Der Kv1.3 Kanal ist, wie auch die anderen Mitglieder der Kv1.x Familie, aus vier symmetrisch angeordneten Untereinheiten, einem sog. Kanaltetramer, aufgebaut (Abb. 1A). Dieses Kanaltetramer kann entweder aus vier identischen Untereinheiten (Homotetramer) oder aus einer Kombination aus vier verschiedenen Untereinheiten (Heterotetramer) aufgebaut sein. Jede Untereinheit besteht wiederum aus sechs Transmembranhelices, S1-S6 (Abb.1C). S1-S4 bilden die Spannungssensordomäne, wobei S4 dabei eine wichtige Rolle spielt. Durch die in S4 an jeder dritten Position vorkommenden positiven Ladungen (Perozo et al., 1994, Tombola et al., 2005) kann diese Untereinheit Veränderungen im Membranpotential wahrnehmen und so zu einer Aktivierung (Öffnung) des Kanals führen. Der Spannungssensor ist über einen sogenannten S4-S5-Linker mit dem Porenbereich, bestehend aus S5 und S6, verbunden (Tombola et al, 2005). Zwischen S5 und S6 befindet sich die Porenschleife des Kanals. In dieser Porenschleife befindet sich ein für Kaliumkanäle typisches Sequenzmotif (GYGD; Heginbotham et al., 1994). Die Porenschleifen aller vier Untereinheiten bilden den sog. Selektivitätsfilter (Abb. 1B), der für den selektiven Durchtritt von Kaliumionen durch die zentrale Pore verantwortlich ist.

1.1.2 Kanalzustände

Spannungsabhängige Kaliumkanäle können Veränderungen des Membranpotentials wahrnehmen und dementsprechend ihren Zustand ändern. Die drei Zustände, in welchen sich der Kanal befinden kann, sind dabei aus elektrophysiologischen Messungen bekannt. Bei Potentialdifferenzen, die negativer als das Ruhemembranpotential von -80 mV sind, befinden sich die Kv1.3 Kanäle in einem geschlossenen, nicht-leitenden Zustand (C) (Abb. 2A,B). Wird die Zellmembran depolarisiert, d.h. beim Übergang von negativen zu positiveren Potentialen, gehen die Kanäle dann in einen offenen, leitenden Zustand (O) (Abb. 2A,B) über. In diesem Zustand können Kaliumionen durch die zentrale Pore durchtreten und erzeugen einen Strom, der elektrophysiologisch aufgezeichnet werden kann. Bei einer länger andauernden Depolarisation gehen die Kanäle in einen dritten Zustand, den nicht leitenden C-Typ inaktivierten Zustand (inactivated (I)) (Abb. 2A,B) über. Dies äußert sich durch einen Abfall des

Stromes (Abb. 2B, (I)), nachdem der Spitzenstrom erreicht wurde und ist typisch für Kv1.3 Kanäle.

A



B

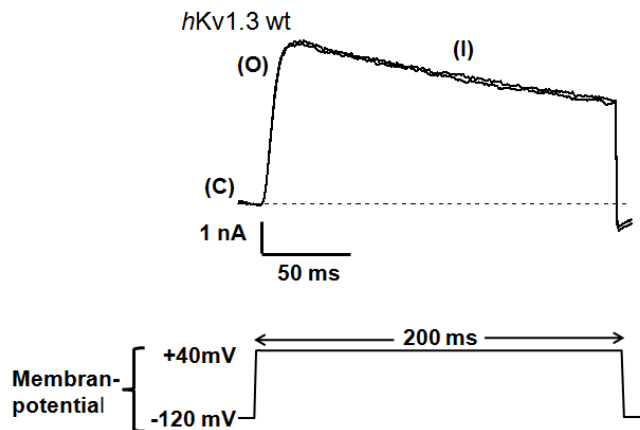
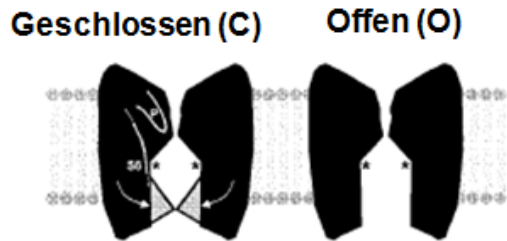


Abbildung 2: A, Vereinfachte Darstellung der verschiedenen Kanalzustände des *hKv1.3*. C steht für den geschlossenen, nicht leitenden, O für den offenen, leitenden und I für den nicht-leitenden, C-Typ inaktivierten Zustand. B, Oben: Beispielhafte Stromspur für den *hKv1.3* Wildtyp Kanal. Unten: Entsprechende Veränderung des Membranpotentials, die zu der oben gezeigten Stromspur führt.

Aus elektrophysiologischen Messungen wurde dabei auch hergeleitet, welche Strukturänderungen am Kanal geschehen müssen, damit der Kanal von einem in den anderen Zustand übergeht.

Für die Aktivierung des Kanal bzw. für den Übergang vom geschlossen in den offenen Zustand, ist dabei die Öffnung eines Tores des sog. „activation gates“ (Liu et al., 1997) an der intrazellulären Seite des Kanals notwendig.

A



B

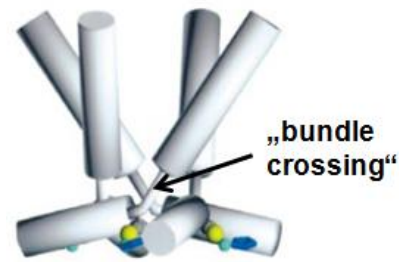


Abbildung 3: A, Schematische Darstellung des Kv1.3 Kanals, die intrazelluläre Seite ist unten, die extrazelluläre Seite ist oben. In grau dargestellt ist die Position des für die Aktivierung notwendigen Tores in der geschlossenen (links) und in der offenen (rechts) Konformation (Liu et al., 1997). B, Schematische Darstellung des „bundle crossings“. Grau dargestellt sind die Transmembranhelices S6 von jeder Untereinheit (del Camino et al., 2000).

Dieses Gate wird von den vier S6-Segmenten gebildet, die im geschlossenen Zustand so nahe aneinander liegen, dass sie an die Spitze eines Zeltes erinnern, weshalb hier von einem „bundle crossings“ (Abb. 3B) gesprochen wird (Holmgreen et al., 1998; Doyle et al., 1998). Im offenen Zustand schwingen die S6-Segmente dann auseinander und das Gate ist geöffnet, sodass Ionen durch die zentrale Pore des Kanals fließen können. Dieses Modell des „Gatings“ wurde von Long et al. (2005) bestätigt, die ein Kanalmodell basierend auf Kristallisationsdaten veröffentlichten, das den Kv1.2 Kanal im offenen Zustand zeigt. Dies bedeutet, dass die Daten, der elektrophysiologischen Messungen von Holmgreen et al. (1998) mit den Daten des Kristallisationsmodells übereinstimmen.

Für den Übergang vom offenen in den C-Typ inaktivierten Zustand werden zwei verschiedene Modelle diskutiert. Zum einen wird vermutet, dass dieser Zustand durch einen partiellen Kollaps des Selektivitätsfilters (Abb. 4A) verursacht wird (Yellen, 1998), durch den dann keine Ionen mehr fließen können. Hinweise darauf lieferten Messungen, bei denen die Kaliumkonzentration vermindert wurde, was zu einer Änderung der Selektivität des Kanals führte (Kiss et al., 1998, López-Barneo et al., 1993), obwohl die Strukturänderung bedingt durch den Kaliummangel nicht dieselbe wie die des C-Typ inaktivierten Zustandes ist (Jäger et al., 1998).

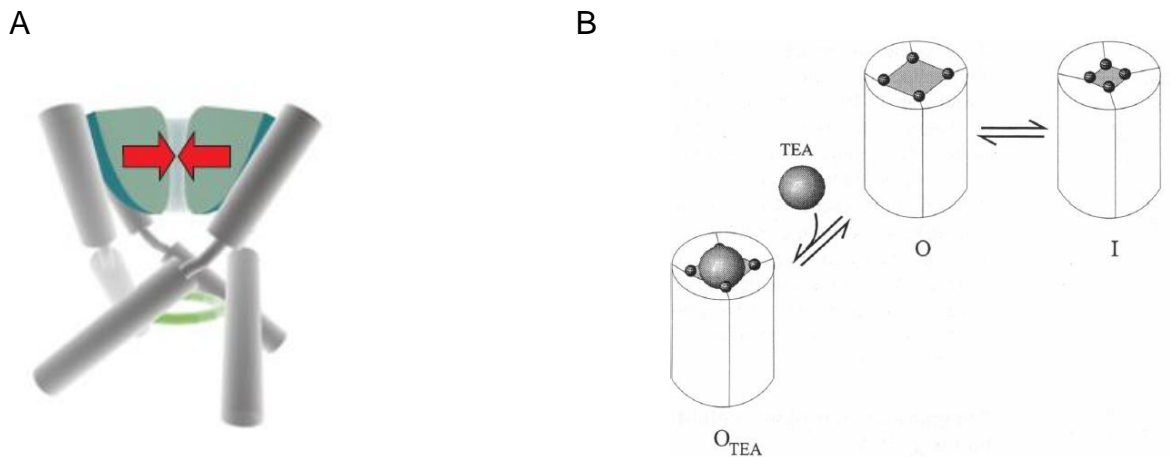


Abbildung 4: Modell für den C-Typ inaktivierten Zustand A, Modell der Verengung des Selektivitätsfilters, der in grün dargestellt ist. Die roten Pfeile repräsentieren die Bewegung der einzelnen Porenschleifen (Yellen, 2002). B, Modell der Verengung des externen Vestibüls, oberhalb des Selektivitätsfilters. I repräsentiert den inaktivierten, O den offenen Zustand und O_{TEA} den von TEA blockierten Zustand. TEA bindet am externen Vestibül und verhindert somit die Verengung desselbigen (Yellen et al., 1994).

Allerdings wurde dieses Modell durch die Kristallisation des KcsA Kanal, eines bakteriellen Kanals, der sich durch pH-Veränderungen öffnet, bestätigt. Für diesen Kanal wurde gezeigt, dass die Inaktivierung durch eine Verengung des Selektivitätsfilters an der Position 2 und 3 bedingt ist (Cuello et al., 2010).

Unabhängig davon existiert noch ein weiteres Modell für den C-Typ inaktivierten Zustand, das von einer Verengung des externen Vestibüls, oberhalb des Selektivitätsfilters, ausgeht (Liu et al., 1996, Abb. 4B). Hinweise darauf lieferten TEA-Bindungsstudien. Von TEA ist bekannt, dass es oberhalb des Selektivitätsfilters bindet und bei extrazellulärer Applikation zu einer verlangsamten Inaktivierung führt (Grissmer et al., 1989; Choi et al., 1991). Die verlangsamte Inaktivierung wurde auf die Verhinderung der Verengung des externen Vestibüls, bedingt durch das TEA-Molekül zurückgeführt.

1.2 Vorkommen und Bedeutung von Kv1.3

1.2.1 Vorkommen von Kv1.3 Untereinheiten

Untereinheiten des Kv1.3 Kanals kommen in vielen Geweben vor und wurden zum Beispiel schon in der grauen Substanz des Gehirns (Coleman et al. 1999) oder in Makrophagen nachgewiesen (Vincente et al., 2006). Des Weiteren kommt der

Kanal als Homotetramer in T-Lymphozyten vor (Grissmer et al. 1990). Dort spielt er eine wichtige Rolle in der T-Zellaktivierung nach Bindung eines Antigens an den T-Zell-Rezeptor.

1.2.2 Physiologische Rolle des *hKv1.3* Kanals auf T-Lymphozyten

Wie bereits erwähnt ist der *hKv1.3* Kanal wichtig für die T-Zellaktivierung. Die Bindung eines Antigens an den T-Zellrezeptor führt über eine IP-3 abhängige Signalkaskade zur Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (Cahalan et al., 1997). Der Mangel an Calcium im endoplasmatischen Retikulum führt dann zur Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen (sog. CRAC-Kanäle), durch die dann noch mehr Calcium in die Zelle fließen kann. Dieses Calcium führt anschließend über eine andere Signalkaskade zur Produktion von Interleukin-2 (Cahalan et al., 1997), das für die T-Zellproliferation notwendig ist. Der Anstieg an intrazellulärem Calcium führt jedoch zur Depolarisation der Zelle und würde den weiteren Calciumeinstrom durch die CRAC-Kanäle behindern (Fanger et al., 2001). Deshalb gibt es auf den T-Lymphozyten noch weitere Kanäle, die *Kv1.3* Kanäle, die sich bei Depolarisation öffnen, zu einem Kaliumausstrom und somit zur Hyperpolarisation der Zelle führen. Dadurch ist ein weiterer Calciumeinstrom, der für die IL-2 Produktion benötigt wird, in die Zelle gewährleistet. Die *Kv1.3* Kanäle fungieren somit als sekundäre Regulatoren des Calciumeinstroms in den T-Lymphozyten. Eine Blockade der *Kv1.3* Kanäle könnte folglich die Aktivierung der T-Zellen behindern und würde in einer abgeschwächten Immunantwort resultieren. Diesen Effekt könnte man sich durch potentielle Medikamente zu Nutze machen, um zum Beispiel allergische Reaktionen vom Typ IV, an welcher T-Zellen maßgeblich beteiligt sind, oder Multiple Sklerose zu behandeln. Einzelne Tierversuche haben dabei gezeigt, dass es potente Toxine, z.B. der Seeanemone *Stichodactyla helianthus*, gibt, die den *Kv1.3* inhibieren können und so zu einer abgeschwächten Immunantwort bei experimentell autoimmuner Enzephalitis (ein Modell für Multiple Sklerose) führen (Beeton et al., 2005). Allerdings führte dieses Toxin bei nicht intakter Blut-Hirn-Schranke zur Toxizität an im Gehirn vorkommenden *Kv1.1* Kanälen und so zum Tod der Versuchstiere. Da die Blut-Hirn-Schranke u.a. bei Multipler Sklerose nicht intakt ist, also der Krankheit, die

mit dem Toxin behandelt werden soll, kann davon in menschlichen Versuchen kein Gebrauch gemacht werden.

1.2.3 MTS-Reagenzien

Wie bereits in 1.2.2 erwähnt könnten Medikamente, die spezifisch den Kv1.3 Kanal blockieren, in der Behandlung von Autoimmunkrankheiten eingesetzt werden. Da der C-Typ inaktivierte Zustand typisch für Kv1.3 Kanäle ist, wäre es rational Toxine und später Medikamente zu entwickeln, die nur an den C-Typ inaktivierten Zustand und nicht an den offenen oder geschlossenen Zustand binden können. Für die Entwicklung eines solchen Medikamentes ist es jedoch essentiell mehr über die dreidimensionale Struktur des C-Typ inaktivierten Zustandes und der Funktion einzelner Aminosäuren in diesem Zustand zu erfahren. Zwar gibt es schon, wie in 1.1.2 erwähnt, ein dreidimensionales Modell für den C-Typ inaktivierten Zustand, allerdings beruht es auf einem prokaryotischen Kaliumkanal und es ist nicht klar, ob dieses Modell auf eukaryotische Kaliumkanäle übertragen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Valin an der Position 417 im Kanal zu einem Cystein mutiert und untersucht, ob die Seitenkette des Cysteins der zentralen Pore zugewandt ist, sodass sie durch MTS-Reagenzien modifizierbar ist und ob diese Aminosäure möglicherweise eine Rolle in der C-Typ Inaktivierung spielt. Die Mutation zu einem Cystein wurde dabei gewählt, weil eine spätere Behandlung mit MTS-Reagenzien dadurch möglich wurde. MTS-Reagenzien reagieren spezifisch mit Thiolen, der Seitengruppe von Cysteinen, unter Bildung von Disulfidbrücken (Akabas et al., 1994; siehe auch Abb.5).

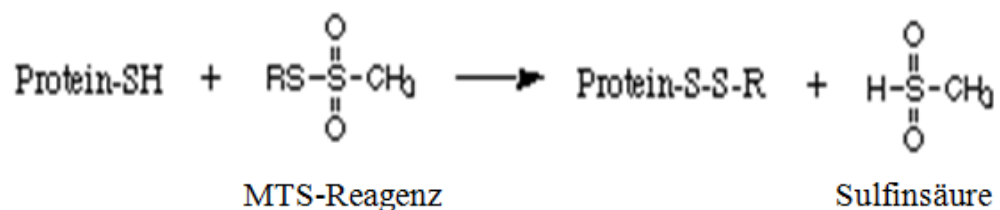


Abbildung 5: Schema der Interaktion zwischen einem Protein, das eine Thiolgruppe (S-H) trägt und Methanthiosulfonat (MTS)-Reagenzien (Quelle: D. S. Dime, TRC Canada)

MTS-Reagenzien wurden schon früher benutzt und waren z.B. hilfreich, um die Bewegung von S4 während der Depolarisation in Natriumkanälen näher zu charakterisieren (Yang et al., 1996). Außerdem wurden sie benutzt, um die Position des „activation gates, das zwischen Position 477 und 482 im *Shaker* Kanal ist, zu bestimmen (Liu et al., 1997) und sie waren hilfreich, um den Durchtritt von Ionen durch eine sogenannte Omega-Pore im *Shaker*-Kanal zu bestimmen (Tombola et al., 2007).

Teile dieser Arbeit wurden im British Journal of Pharmacology unter dem Titel „Effect of verapamil on the action of methanethiosulfonate reagents on human voltage-gated $K_v1.3$ channels: implications for the C-type inactivated state“ von Schmid S. I. und Grissmer S. im Mai 2011 publiziert.

2. Zielsetzung

Die dreidimensionale Struktur des *hKv1.3* Kanals im inaktivierten Zustand ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Zwar gibt es, wie bereits in 1.1.2. erwähnt, ein dreidimensionales Modell für diesen Zustand für einen bakteriellen Kanal, allerdings ist die Übertragung dieses Modells auf den *humanen Kv1.3* Kanals fraglich, auch deshalb, weil für die humanen Kanäle zwei verschiedene Modelle (siehe 1.1.2) diskutiert werden. Um herauszufinden, ob die Aminosäure an der Position 417 im Porenbereich des Kanals in die C-Typ Inaktivierung involviert ist, wurde diese Aminosäure durch ein Cystein ersetzt. Diese Mutation wurde dabei gewählt, da Cysteine durch MTS-Reagenzien modifizierbar sind (siehe 1.2.3). In der hier vorliegenden Arbeit soll der Unterschied im Stromverhalten zwischen dem Wildtyp-Kanal und dem *hKv1.3_V17C* mutierten Kanal nach MTS-Applikation untersucht werden. Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Zeigt der V417C mutierte Kanal ein anderes Stromverhalten gegenüber MTS-Reagenzien als der Wildtyp-Kanal?
2. Welche Zustände des *hKv1.3_V417C* mutierten Kanals können durch MTS-Reagenzien modifiziert werden bzw. welche Zustände des Kanals sind für MTS-Reagenzien zugänglich?
 - a) Können MTS-Reagenzien den geschlossenen Zustand des mutierten Kanals modifizieren?
 - b) Können MTS-Reagenzien den offenen Zustand des mutierten Kanals modifizieren bzw. haben MTS-Reagenzien Zugang zum offenen Zustand des Kanals?
 - c) Kann der C-Typ inaktivierte Zustand von MTS-Reagenzien modifiziert werden?
3. Kann Verapamil die MTS-Modifikation verhindern?
4. Von welcher Seite des Kanals (intra- oder extrazellulär) wirken MTS-Reagenzien?

3. Material und Methoden

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Lösungen und Reagenzien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland), Merk KGaA (Darmstadt, Deutschland), Invitrogen Ltd. (Paisley Schottland, UK) 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 7,2, mit 5 M NaOH) wurde zur Herstellung bakterieller Flüssigkulturen verwendet. Zur Herstellung fester Nährböden (LB Agarplatten) wurde dieses mit 20 g/l Agar versetzt. Direkt nach der Herstellung wurden die Medien in einem Autoklaven bei einer Temperatur von 120°C und einem Druck von 1,2 bar für 20 min sterilisiert.

Um nach der Sterilisation ein selektives Wachstum zu erreichen, wurden die Medien bei einer Temperatur von ca. 60°C mit Ampicillin, dessen Endkonzentration 100 mg/l betrug, versetzt (LB^{+Amp} Medien). Die für diesen Zweck verwendete, sterilfiltrierte Stocklösung beinhaltete 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 2xYT Medium (5g/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 freundlicherweise von Prof. Dr. O. Pongs (Institut für Neuronale Signalverarbeitung, Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg), dasjenige für den mutierten Kanal *hKv1.3_V417C* von Dr. T. Dreker (4SC AG, Martinsried, Deutschland) und dasjenige für den *hKv1.3_H399T-V417C* von Dr. Sylvia Prütting (4SC AG, Martinsried, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid enthält einen pRc/CMV Vektor (Invitrogen Ltd., Paisley, Schottland, UK). In diesen Vektor ist das gesamte humane Kv1.3 Kaliumkanal-Gen bzw. das mutierte Gen eingebaut und er enthält einen CMV Promotor für die Expression des klonierten *hKv1.3* Kaliumkanal Gens bzw. des mutierten Gens in Säugetierzellen sowie ein Gen für die Resistenz gegenüber Ampicillin.

3.1.3 Transformation

Für die Amplifikation des Plasmids bzw. für die Transformation wurde der E.coli Stamm XL-10 Gold der Firma Stratagene (Amsterdam, Niederlande) verwendet. Hierbei wurde die Plasmid-DNA in die E.coli Bakterien eingeschleust. Dafür wurden 50 µl Bakterien (Zelldichte= $\sim 1 \cdot 10^8$ /ml) auf Eis aufgetaut und anschließend mit ca. 10 ng Plasmid-DNA vermischt. Im Anschluss wurde das Gemisch für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert und danach in einem Heizblock für 60 s bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Anschließend erfolgte eine weitere 30 minütige Inkubation auf Eis, nach welcher dem Ansatz 500 µl 2xYT Medium zugegeben wurde. Das Gemisch aus Bakterien und Medium wurde danach für eine Stunde bei 37°C bei 300-500 UpM geschüttelt. Zum Schluss wurden 300 µl des Ansatzes auf selektive LB^{+Amp} Agarplatten gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. In diesem Fall wachsen nur Ampicillin-resistente Bakterien, d.h. diejenigen Bakterien, die das Gen für die Ampicillin Resistenz tragen.

3.1.4 Isolierung der Plasmid-DNA

Um ausreichende Mengen an Plasmid-DNA für die Transfektion zu gewinnen, wurde das GFX™ Micra Plasmid Prep Kit (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) verwendet. Die Präparation erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellers. Die Bestimmung der Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA erfolgte photometrisch (GeneQuant 1300 Photometer, GE Healthcare, München, Deutschland) mittels Absorption von Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Lösungen und Reagenzien

Zur Kultivierung der COS-7 Zelllinie wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, Invitrogen LTD., Paisley, Schottland, UK, Kat.-Nr. 41966-029) angereichert mit 10% Rinderserum (FBS, Thermo Fisher Scientific, Bonn Deutschland, Kat.-Nr. CH30160.02/03) verwendet. Zum Waschen der Zellen, das

dem Entfernen toter Zellen diente, wurde Mg^{2+} - und Ca^{2+} freies PBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich, Kat.-Nr. H15-002) verwendet. Die Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflaschen erfolgte mit einer 0,05 %-igen Trypsin-EDTA Lösung (0,5 g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA*4Na in Hank's Balanced Salt Solution ohne $CaCl_2$, $MgCl_2$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Invitrogen Ltd., Paisley, Schottland, UK, Kat.-Nr. 25300). Die Glasobjektträger wurden zur besseren Adhäsion der Zellen vor dem Auftragen der Zellen mit 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin Lösung (Poly-L-Lysin, gelöst in sterilem Wasser) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland, Kat.-Nr. P4832) beschichtet.

3.2.2 Kultivierung der COS-7 Zelllinie

Die COS-7 (African green monkey kidney) Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland (DSMZ, Nr. ACC 60) bezogen. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und einem CO_2 Partialdruck von 10% kultiviert. In regelmäßigen Abständen von 3-4 Tagen wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:10 oder 1:5 gesplittet. Dabei wurde das Kulturmedium unter sterilen Bedingungen abgesaugt und die Zellen im Anschluss mit Trypsin-EDTA (siehe 3.2.1) überschichtet. Nach 1-2 minütiger Inkubation wurde die Trypsin-EDTA Lösung entfernt und die Zellen wurden erneut zum besseren Ablösen für ca. 1 Minute in den Brutschrank gegeben. Danach wurden die Zellen in frischem Kulturmedium suspendiert und in die neuen Kulturflaschen gegeben, die bereits mit frischem Medium befüllt waren.

3.2.3 Transfektion mit Plasmid-DNA

Die COS-7 Zellen wurden mittels FuGene 6 Transfektionsreagenz der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) transfiziert. Dabei wurde einerseits die Plasmid DNA des *hKv1.3* Wildtyps zusammen mit dem Vektor für das Green Fluorescent Protein (GFP) (eGFP-N1 Plasmid-DNA, Clontech Laboratories, Inc, Palo Alto, USA) verwendet, d.h. die Zellen wurden mit beiden Plasmiden kotransfiziert. Andererseits wurde für die Expression der mutierten Kanäle die Plasmid-DNA der Mutante, entweder *hKv1.3_V417C* oder *hKv1.3_H399T-V417C*, zusammen mit dem Vektor für das Green Fluorescent Protein (s. oben), kotransfiziert.

Das GFP diente hier zur späteren Identifizierung der erfolgreich kotransfizierten Zellen. Bevor die eigentliche Transfektion erfolgte, wurden während des Splittvorganges ca. 500 µl der Zellen in 35 mm Zellkulturschälchen überführt und mit 2 ml Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden danach für mind. 4 Stunden bis 3 Tage im Inkubator aufbewahrt bis das Transfektionsgemisch hinzugegeben wurde. Dieses Gemisch wurde dabei nach folgendem Protokoll hergestellt. 95 µl D-MEM ohne FBS wurden zusammen mit 5 µl FuGene 6 Transfektionsreagenz in ein 1,5 ml Eppendorf Tube gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden ca. 1 µg Plasmid-DNA und 0,5 µg des Vektors für das GFP zugegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium der vorbereiteten Zellkulturschälchen abgesaugt, das Transfektionsgemisch auf die Zellen gegeben und für weitere zwei Minuten inkubiert. Danach wurde das Zellkulturschälchen wieder mit 2 ml Kulturmedium aufgefüllt und in den Inkubator gestellt. Nach 1-4 Tagen in diesem konnten die Zellen für die elektrophysiologischen Messungen verwendet werden.

3.2.4 Präparation der Zellen für die elektrophysiologischen Messungen

Das Kulturmedium wurde aus den Zellkulturschalen abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS (siehe 3.2.1) behandelt, um tote Zellen im anschließenden Absaugvorgang auszuwaschen und im Anschluss mit Trypsin-EDTA (siehe 3.2.1) überschichtet. Dieses verblieb, wie beim Splittvorgang, für ca. 1 Minute in dem Kulturschälchen ehe es abgesaugt und die Zellen für ca. zwei Minuten in den Inkubator gegeben wurden. Im Anschluss wurden die Zellen mit 2 ml Kulturmedium suspendiert und auf spezielle, zur besseren Adhäsion mit Poly-L-Lysin (siehe 3.2.1) behandelte Glasobjektträger überführt. Es handelte sich hier um handelsübliche Deckgläser für die Mikroskopie (24x24 mm, Stärke 0,13-0,16 mm, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), auf die mit Hilfe eines Silikatelastomers (SYLGARD 186, Dow Corning, Inc., Midland, USA) ein Teflonring (O-Ring N.DIN PTFE, THF GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) fixiert war. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C und 10% CO₂ Partialdruck hafteten ausreichend Zellen für die elektrophysiologischen Messungen am Glasobjektträger.

3.3 Elektrophysiologie

3.3.1 Lösungen und Reagenzien

Die extrazelluläre Badlösung setzte sich wie folgt zusammen: 160 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES und die intrazelluläre Pipettenlösung enthielt folgende Substanzen: 155 mM KF, 10 mM K-EGTA, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES. Die Einstellung des pHs auf 7,4 für die externe und auf 7,2 für die interne Lösung erfolgte mit einer einmolaren Lösung von NaOH für die Bad- bzw. KOH für die Pipettenlösung. Die Osmolarität der Lösungen lag in einem Bereich von 290-320 mOsm.

Das verwendete Verapamil wurde als (±)-Verapamil von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Die Substanz wurde in DMSO gelöst und als 100 mM Stocklösung bei +4°C im Dunkeln gelagert. Zur Applikation wurde sie in extrazellulärer Badlösung auf die Endkonzentration verdünnt. Hierbei betrug der DMSO-Anteil in der extrazellulären Lösung maximal 0,1%.

Die MTS-Reagenzien (MTSEA, Kat.-Nr. A609100; MTSES, Kat.-Nr. S672000; MTSET, Kat.-Nr. T795900) wurden von der Firma Toronto Research Chemicals, Inc. (North York, Canada) erworben. Die Festsubstanzen wurden als 1 M Stocklösungen in sterilem Wasser gelöst und bei -20°C im Dunkeln aufbewahrt. Zur Applikation wurden MTSEA, MTSET und MTSES in extrazellulärer Lösung auf eine Endkonzentration von 1 mM sowie MTSEA, MTSET und MTSES in intrazellulärer Lösung auf eine Endkonzentration von 1 mM für MTSEA und 5 mM für MTSET und MTSES verdünnt.

3.3.1 Aufbau der Patch-Clamp Apparatur

Der Messplatz für die elektrophysiologischen Messungen bestand aus einem Invertmikroskop, dem Axiovert 100 (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland). Dieses Mikroskop war auf einem pressluftgefederten Tisch (Newport Corporation, Irvine, USA) installiert, der der Vibrationsdämpfung diente. Des Weiteren war das Mikroskop mit einer Fluoreszenzeinheit ausgestattet, mit der die Identifikation der erfolgreich mit GFP-kotransfizierten Zellen erfolgte. Zur Auslösung und Aufnahme von Membranströmen war ein EPC-9 Patch-Clamp-Verstärker (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht, Deutschland) installiert, der mit einem Dell-Computer

verbunden war. Die Software PatchMaster 2.0 (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht, Deutschland) diente der Aufnahme und Speicherung von Daten sowie der Subtraktion von kapazitiven Strömen. Außerdem konnte mit ihr der Verstärker angesteuert werden.

3.3.2 Versuchsdurchführung

Die verwendeten Elektroden bestanden aus einem chlorierten Silberdraht. Dabei befand sich die Pipettenelektrode, umgeben von Pipettenlösung, in einer Glaskapillare. Die Badelektrode befand sich in einem Kunststoffschlauch, umgeben von einer Agarosebrücke. Über die Agarosebrücke hatte die Badelektrode Kontakt zur Badlösung.

Die verwendeten Glaskapillaren (GB150-TF10) wurden von der Firma Science Products GmbH (Hofheim, Deutschland) bezogen und mittels eines Zeitz DMZ Universal Puller (Zeitz-Instruments Vertriebs GmbH, München, Deutschland) in drei Stufen gezogen. Anschließend wurden sie feuerpoliert, bis ein Pipettenwiderstand von 2-4 M Ω erreicht wurde.

Die Zellen befanden sich auf einem Glasobjektträger, auf dem ein Teflonring zur Aufnahme der Badlösung und Begrenzung der Badkammer fixiert war. Die Badlösung wurde dabei mit Hilfe einer 5 ml Einwegspritze vorsichtig eingewaschen und überschüssige Lösung automatisch abgesaugt.

3.3.3 Messverfahren

Alle Messungen erfolgten entweder in der whole-cell (*hKv1.3_V417C*, *hKv1.3_H399T-V417C*, *hKv1.3 wt*) oder in der outside-out (*hKv1.3 wt*) Konfiguration (Hamill et al., 1981). Alle Ströme wurden bei Raumtemperatur (18-22°C) aufgenommen, durch einen 2,9 kHz Bessel Filter gefiltert und in einer Frequenzrate von 1-3 kHz aufgezeichnet. Leckströme wurden mit Hilfe der Software PatchMaster 2.0 (siehe 3.3.1), wenn nicht anders vermerkt, subtrahiert.

Für Messungen, in denen die Ströme einen Wert von 2 nA überschritten, wurde eine Serienwiderstandskompensation von 75-85% durchgeführt. Das Haltepotential lag, wenn nicht gesondert vermerkt, bei -120 mV.

3.3.4 Auswertung der Daten

Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm FitMaster 2.00 (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht, Deutschland), der Software Igor Pro 3.12. (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, Oregon, USA) und Microsoft® Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Seattle, USA).

Dabei berechnete das Programm FitMaster automatisch den Spitzenstrom. Dieser konnte dann, aufgetragen gegen die jeweilige Spur, in das Programm Igor Pro exportiert werden. In diesem erfolgte die weitere Datenauswertung. Hier wurde die jeweilige Spur durch die Zeit während des Experiments ersetzt.

Anschließend wurde ein Schaubild erstellt, in dem der Spitzenstrom gegen die Zeit während des Experiments aufgetragen wurde. An dieses Schaubild wurde mit Hilfe der Analysefunktion des Programmes Igor Pro eine Exponentialfunktion angelegt. Die jeweilige Zeitkonstante τ wurde dabei ebenfalls durch das Programm Igor Pro anhand dieser Exponentialfunktion berechnet.

Der Mittelwert und die Standardabweichung für τ wurden mit Hilfe des Programmes Microsoft® Office Excel berechnet und setzten sich jeweils aus mindestens 3 unabhängigen Messungen zusammen.

4. Ergebnisse

Um mehr über die Lage und Funktion einzelner Aminosäuren in einem Protein zu erfahren ist es möglich, einzelne, natürlich im Protein vorkommende Aminosäuren gegen Cysteine auszutauschen. Der Austausch gegen ein Cystein hat dabei den Vorteil, dass eine spätere Behandlung mit MTS-Reagenzien, die spezifisch mit Cysteinen unter Bildung von Disulfidbrücken interagieren (s. Abb. 5), möglich ist (Akabas et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Valin an der Position 417 im *hKv1.3* Kaliumkanal gegen ein Cystein ausgetauscht. Es sollte untersucht werden, ob der mutierte Kanal ein anderes Verhalten gegenüber der Behandlung mit MTS-Reagenzien aufweist als der Wildtyp-Kanal, *hKv1.3*.

4.1 Einfluss von extrazellulär appliziertem MTSEA

Erste Versuche wurden mit MTSEA gemacht, das als neutrales MTS-Reagenz die Membran der Zellen passieren kann. Dabei wurde getestet, ob ein Unterschied im Verhalten gegenüber extrazellulär appliziertem MTSEA zwischen Wildtyp-Kanal und mutiertem Kanal besteht.

4.1.1 *hKv1.3* Wildtyp und *hKv1.3_V417C*

Zunächst wurden Kontrollexperimente am Wildtyp-Kanal in An- und Abwesenheit von MTSEA durchgeführt, wobei Na-Ri als extrazelluläre Badlösung fungierte und als intrazelluläre Pipettenlösung KF verwendet wurde. Das Ergebnis eines solchen Experimentes ist in Abb. 6 A,B gezeigt. Zunächst wurden Ströme in Abwesenheit von MTSEA aufgenommen. Dazu wurde, in der whole-cell Konfiguration der patch-clamp-Technik, das Membranpotential alle 30 Sekunden von einem Haltepotential von -120 mV auf +40 mV für 200 ms verändert. Danach wurde das Membranpotential wieder zurück auf -120 mV gesetzt. Durch die Depolarisation gehen die Kanäle innerhalb von 20 Millisekunden vom geschlossenen in den offenen Zustand über und die Stromamplitude erreicht einen Spitzenwert von ungefähr 5,6 nA. Innerhalb des 200 ms andauernden Spannungspulses fällt der

Strom jedoch ab, sodass er am Ende dieses Pulses einen Wert von ca. 3,5 nA erreicht (Abbildung 6A, Spur a). Diese Abnahme zeigt, dass einige Kanäle in den C-Typ inaktivierten Zustand übergegangen sind. Die Zeitkonstante für diese Inaktivierung (τ_h) beträgt bei +40 mV 352 ± 38 ms (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=5$) und stimmt mit der Literatur überein (291 ms; Dreker et al., 2005).

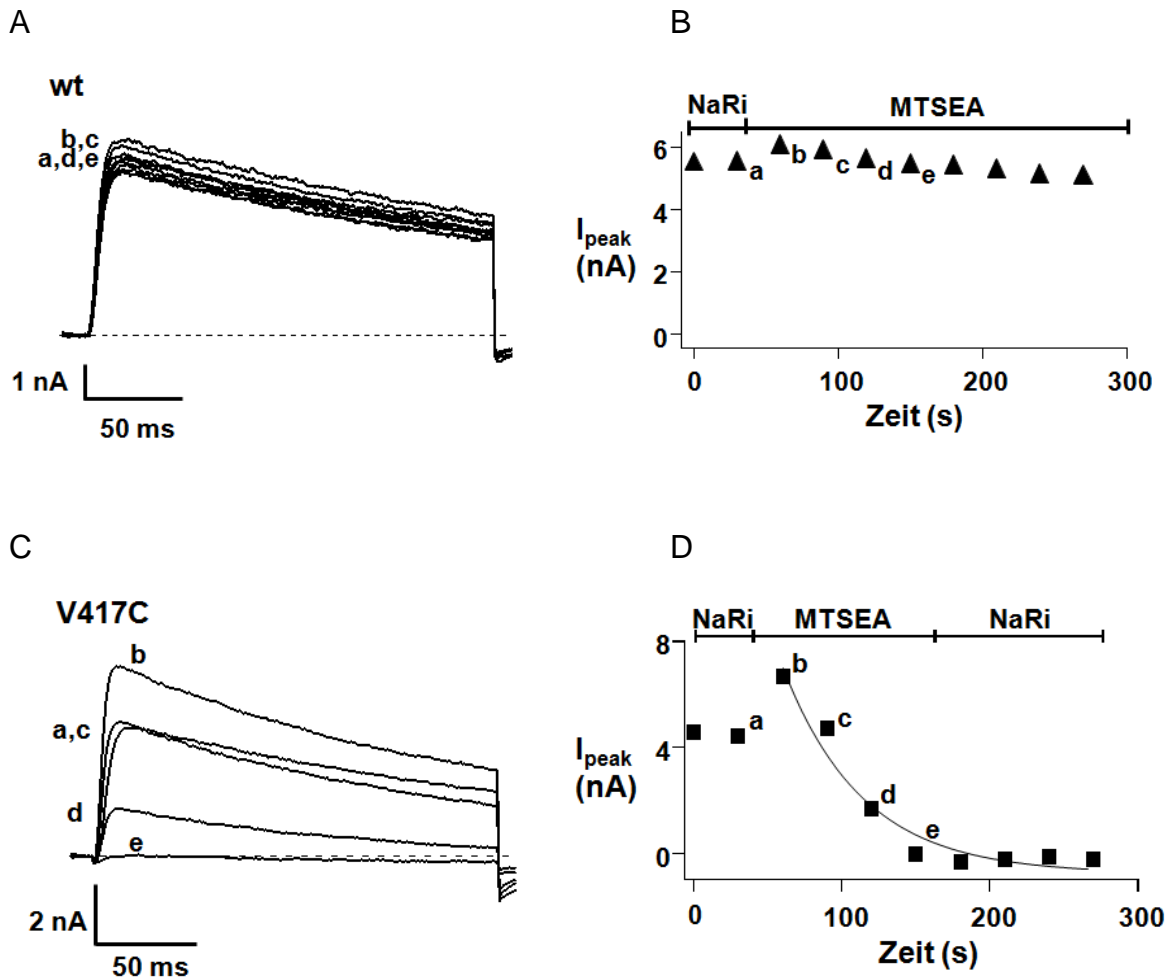


Abbildung 6: Effekt von extrazellulär appliziertem MTSEA (2-Aminoethyl Methanthiosulfonat Hydrobromid) auf Ströme durch *hKv1.3 wt* (A) und *hKv1.3_V417C* (C) mutierte Kanäle (Schmid S. I. and Grissmer S., 2011; Permission by Wiley). A, C, Die Induktion der Ströme erfolgte in der whole-cell Konfiguration durch Spannungspulse von einem Haltepotential von -120 mV auf +40 mV für 200 ms alle 30 Sekunden in An- und Abwesenheit von MTSEA. MTSEA wurde zwischen Spur a und b appliziert. B, D, Spitzenströme (I_{peak}) (in Nanoampere (nA)) der in (A) und (C) gezeigten (und weiteren) Spuren aufgetragen gegen die Zeit während der Messung. Die Bereiche über den Schaubildern (B) und (D) repräsentieren die sich jeweils im Bad befindliche Lösung während der aufgenommenen Stromspuren. NaRi steht dabei für Natrium-Ringer-Lösung. Die durchgezogene Linie in (D) stellt die an die Datenpunkte angelegte Exponentialfunktion dar und zeigt eine Zeitkonstante τ_M von 53 Sekunden.

Im Anschluss wurde die extrazelluläre Badlösung zwischen zwei Spannungspulsen durch eine 1 mM MTSEA-Lösung (MTSEA gelöst in Na-Ri) ersetzt. Dies resultierte in einer sehr langsamen Abnahme des Spitzenstromes (Abb. 6B) innerhalb der ersten 3,5 Minuten nachdem MTSEA in die Badlösung gegeben wurde. Vergleicht man den Spitzenstrom vor MTSEA-Gabe (5,66 nA) mit dem letzten Datenpunkt in Abbildung 6B (5,17 nA) zeigt sich eine Abnahme des Maximalstromes um weniger als 10%. Es sieht also so aus, als könne MTSEA am wt *hKv1.3* Kanal den Strom nur geringfügig vermindern.

Der mutierte *hKv1.3_V417C* Kanal mit dem zusätzlichen Cystein an Position 417 könnte allerdings anders auf das MTSEA reagieren. Aus diesem Grund wurde im Anschluss dasselbe Experiment für den V417C mutierten Kanal durchgeführt. Die Ströme wurden dabei durch dasselbe Spannungspulsprotokoll, das schon für Abbildung 6A beschrieben wurde, ausgelöst. Die ausgelösten Ströme durch den mutierten V417C Kanal zeigten dabei dieselben Charakteristika wie der Wildtyp-Kanal (Abb. 6C, Spur a), wie z.B. eine schnelle Aktivierung der Kanäle und die für *Kv1.3* Kanäle typische C-Typ Inaktivierung. Dies zeigt, dass die eingefügte Mutation das „Gating“ des Kanals nicht verändert hatte. Nachdem einige Spuren in Abwesenheit von MTSEA aufgenommen wurden, wurde wie bereits oben beschrieben, eine 1-millimolare MTSEA-Lösung zwischen zwei Spannungspulsen in das Bad eingewaschen. Dieser Lösungswechsel führte zu einem drastisch veränderten Stromverhalten. Der Strom nahm schnell ab und erreichte innerhalb von 90 Sekunden einen Wert nahe null (Abb. 6 C,D). Auch ein späteres Auswaschen der MTSEA-Lösung mit einer Na-Ri-Lösung konnte den zuvor aufgenommenen Strom nicht wiederherstellen. Dies deutet darauf hin, dass MTSEA eine irreversible Reduktion des Stromes durch den mutierten Kanal induzierte. Um die zeitliche Abnahme des Spitzenstromes besser visualisieren zu können, wurden die Spitzenströme der in Abbildung 6C gezeigten Stromspuren (und andere) gegen die Zeit des Experiments aufgetragen und eine Exponentialfunktion an die Datenpunkte während MTSEA-Gabe angelegt. Die dadurch erhaltene Zeitkonstante für die Abnahme des Stromes durch extrazellulär appliziertes MTSEA wies dabei einen Wert von ~ 50 Sekunden auf. Für weitere Messungen erhielt ich eine Zeitkonstante τ_M für extrazellulär appliziertes MTSEA von 45 ± 9 s (Mittelwert \pm Standardabweichung; $n=5$) für 5 unabhängige Messungen.

Aus diesen beiden Versuchen war ersichtlich, dass die Applikation von extrazellulärem MTSEA im V417C mutierten *hKv1.3* Kanal zu einer drastischen Abnahme des Stromes führt, wohingegen im Wildtyp Kanal ein solches Verhalten gegenüber MTSEA, d.h. eine starke Abnahme des Stromes, nicht beobachtet werden konnte. Allerdings war aus diesen Messungen nicht ersichtlich, ob MTSEA den offenen, inaktivierten oder geschlossenen V417C Kanal modifizieren kann. Um herauszufinden, ob der geschlossene Zustand des *hKv1.3_V417C* Kanals durch extrazellulär appliziertes MTSEA modifiziert werden kann, wurden die in 4.1.2 beschriebenen Experimente durchgeführt.

4.1.2 Effekt von MTSEA auf *hKv1.3* Wildtyp und *hKv1.3_V417C* mutierte Kanäle im geschlossenen Zustand

Um herauszufinden, ob MTSEA den geschlossenen Zustand des mutierten *hKv1.3_V417C* Kanals modifizieren kann, wurden die im Folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt. Als Kontrolle wurde erneut der Wildtyp-Kanal verwendet. Die Ströme wurden auch hier in der whole-cell Konfiguration der patch-clamp Technik nach demselben Pulsprotokoll, das schon für Abbildung 6A beschrieben wurde, ausgelöst (Abb. 7A). Eine 1-millimolare MTSEA-Lösung wurde dabei nach einem Spannungspuls in das Bad eingewaschen und das Pulsprotokoll dann unterbrochen. Um zu gewährleisten, dass alle Kanäle sich im geschlossenen Zustand befanden, wurde während dieser Pause das Membranpotential konstant bei -120 mV gehalten. Nach der Unterbrechung des Pulsprotokoll wurden wieder Spannungspulse nach dem genannten Pulsprotokoll ausgelöst. Dabei zeigte sich, dass der Spitzenstrom nach Wiederaufnahme des Pulsprotokolls (Abb. 7B, Spur b) nicht abgenommen hatte, was darauf hindeutet, dass MTSEA den geschlossenen Zustand des wt Kanals nicht modifizieren kann.

Vergleicht man den Spitzenstrom von Spur a in Abbildung 7B mit dem Spitzenstrom von Spur e in Abbildung 7B, so kann eine Reduktion des Spitzenstromes um ca. 15% festgestellt werden. Dieser Wert ist ähnlich dem Wert für die geringe Stromabnahme an wt Kanälen in Abbildung 6B, als MTSEA zwischen zwei Spannungspulsen appliziert wurde.

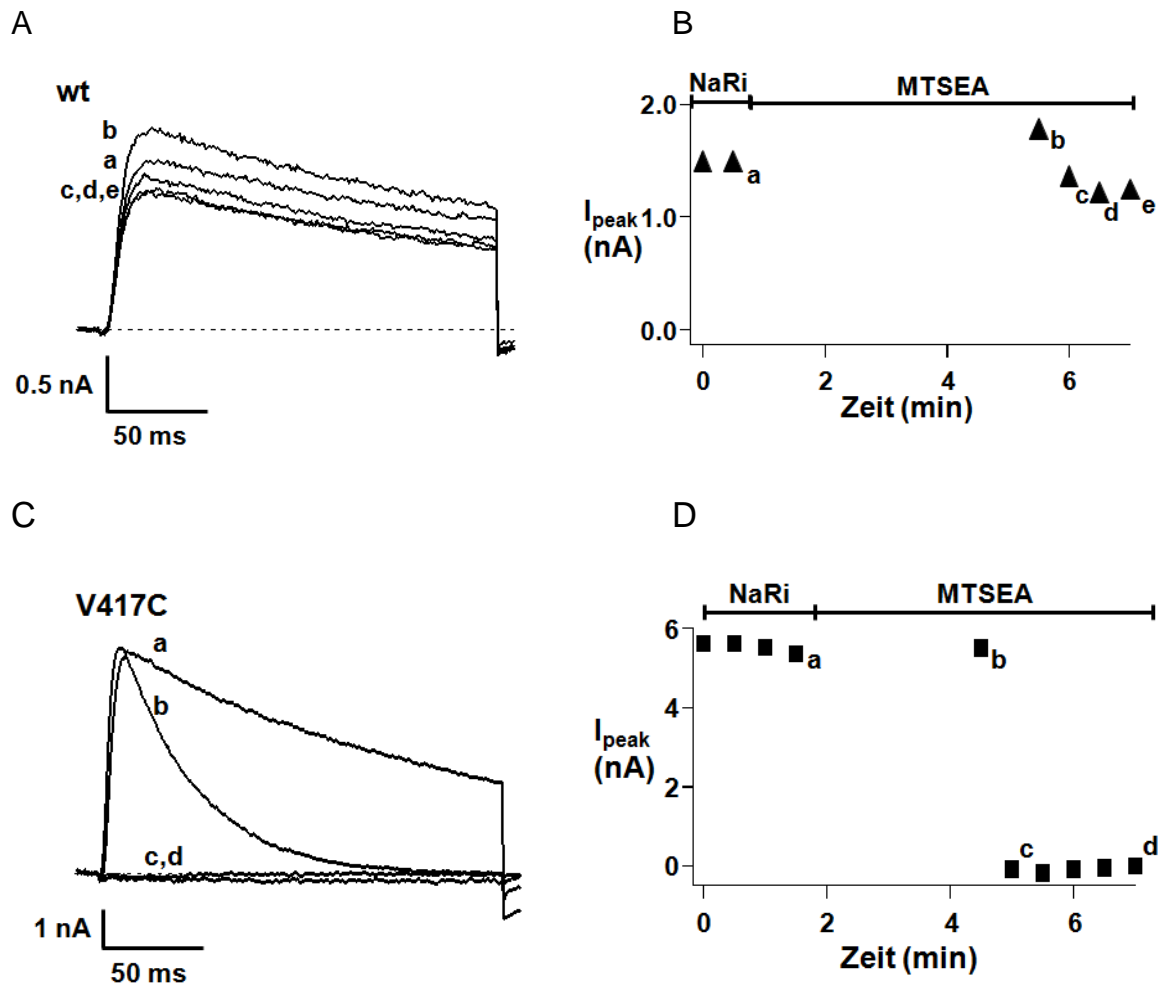


Abbildung 7: Effekt von extrazellulär appliziertem MTSEA (2-Aminoethyl Methanthiosulfonat Hydrobromid) auf Ströme durch den *hKv1.3* wt (A) und den *hKv1.3_V417C* (C) mutierten Kanal im geschlossenen Zustand (Schmid S. I. and Grissmer S., 2011; Permission by Wiley). A, C, Die Induktion der Ströme erfolgte in der whole-cell Konfiguration durch Spannungspulse von einem Haltepotential von -120 mV auf +40 mV für 200 ms alle 30 Sekunden in An- und Abwesenheit von MTSEA. MTSEA wurde nach Spur a appliziert. Zwischen Spur a und Spur b wurde das Pulsprotokoll unterbrochen und die Kanäle bei -120 mV gehalten, um sicherzustellen, dass sie sich im geschlossenen Zustand befinden. B, C, Spitzenströme (I_{peak}) (in Nanoampere (nA)) der in (A) und (C) gezeigten Spuren (und weiteren) aufgetragen gegen die Zeit während der Messung. Die Bereiche über den Schaubildern (B) und (D) repräsentieren die sich jeweils im Bad befindliche Lösung während der aufgenommenen Stromspuren. NaRi steht dabei für Natrium-Ringer-Lösung.

Um herauszufinden, ob der V417C mutierte Kanal im geschlossenen Zustand durch extrazellulär appliziertes MTSEA modifiziert werden kann, wurde derselbe Versuch mit dem mutierten Kanal durchgeführt. Falls MTSEA den geschlossenen Zustand dieses Kanals modifizieren kann, müssten 3 Minuten ausreichend sein, um den Strom komplett zu blockieren (vgl. Abbildung 6C,D). Der Strom nach der 3-minütigen Pause zeigte (Abb. 7C, Spur b), wie auch im Wildtyp-Kanal, allerdings

denselben Spitzenstrom wie vor der MTSEA-Gabe. Obwohl der Spitzenstrom nach der 3-minütigen Pause sich nicht verändert hatte, was darauf hindeutet, dass der geschlossene Zustand des mutierten Kanal durch MTSEA nicht modifiziert werden kann, zeigte die erste Spur (Abb. 7C, Spur b) nach der Pause eine drastisch veränderte Zeitkonstante für die Stromreduktion während eines depolarisierenden Pulses. Der Strom erreichte schon innerhalb des ersten 200 ms andauernden Spannungspulses einen Wert nahe null. Auch in den darauffolgenden Spuren konnte kein Strom mehr ausgelöst bzw. beobachtet werden.

Um einen Wert für beide Zeitkonstanten für die Stromreduktion während der Depolarisation, d.h. vor und nach MTSEA-Applikation zu erhalten, wurde sowohl an Spur a als auch an Spur b in Abb. 7C eine Exponentialfunktion angelegt. Die erhaltenen Zeitkonstanten τ_h wiesen einen Wert von 205 ms für Spur a und 35 ms für Spur b auf. Die Zeitkonstante in Anwesenheit von MTSEA war daher ca. 6 mal schneller als vor der Applikation von MTSEA.

Um den Zeitverlauf des Experimentes und die durch MTSEA hervorgerufene Stromabnahme besser darstellen zu können, wurden die Spitzenströme der jeweils aufgenommen Stromspuren gegen die Zeit aufgetragen. Dabei zeigte sich, dass der Spitzenstrom von einer (Abb. 7D, Spur b) zur anderen Spur (Abb. 7D, Spur c) vollständig abnahm. Es sieht also so aus, als ob MTSEA den geschlossenen Kanal nicht modifizieren kann, da eine Modifikation erst möglich war, nachdem die Kanäle durch einen Spannungspuls auf +40 mV geöffnet wurden. Es könnte allerdings sein, dass MTSEA zwar den geschlossenen Kanal modifizieren, d.h. an seine Bindungsstelle gelangen kann, aber die Stromabnahme erst sichtbar wird, wenn der Kanal in den offenen Zustand übergeht.

Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde das im Folgenden beschriebene Experiment durchgeführt. MTSEA wurde nach einem Spannungspuls in das Bad eingewaschen und das Pulsprotokoll angehalten, während das Membranpotential konstant bei -120 mV gehalten wurde, um sicherzustellen, dass alle Kanäle sich im geschlossenen Zustand befinden. Nach 3 Minuten wurde die Badlösung gegen eine Na-Ri-Lösung ausgetauscht, um MTSEA aus dem Bad zu entfernen. Nach weiteren 2 Minuten Wartezeit wurde das Pulsprotokoll wieder gestartet (Abb. 8B). Wenn MTSEA tatsächlich den geschlossenen Zustand modifizieren könnte, wäre eine Modifikation nicht mehr reversibel, da MTSEA nach 3 Minuten im Bad schon

mit den Cysteinen unter Bildung einer Disulfidbrücke interagiert hätte. Eine solche kovalente Bindung könnte durch Waschen mit einer Na-Ri-Lösung nicht rückgängig gemacht werden.

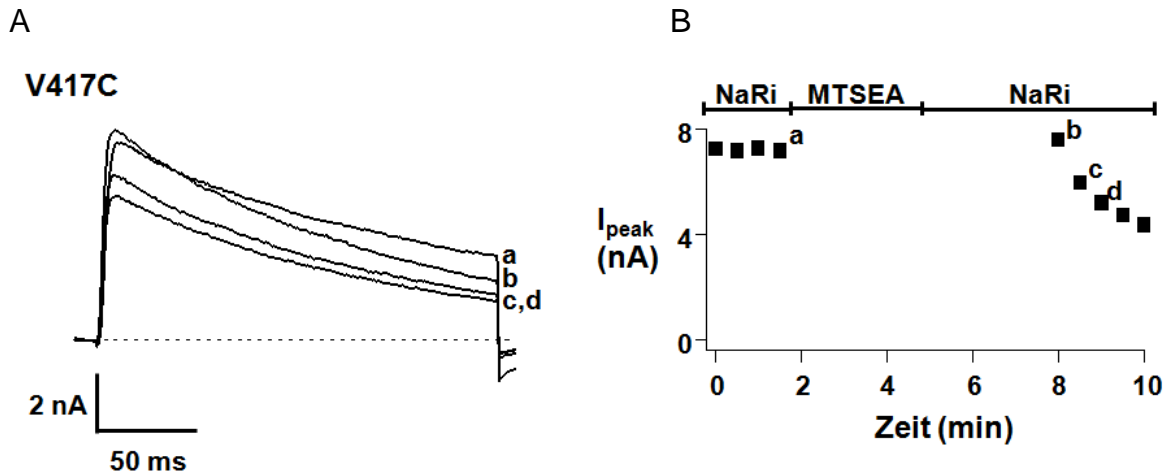


Abbildung 8: Effekt von extrazellulär appliziertem und wieder ausgewaschenem MTSEA (2-Aminoethyl Methanthiosulfonat Hydrobromid) auf Ströme durch *hKv1.3_V417C* mutierte Kanäle im geschlossenen Zustand (Schmid S. I. and Grissmer S., 2011; Permission by Wiley). A, Die Induktion der Ströme erfolgte in der whole-cell Konfiguration durch Spannungspulse von einem Haltepotential von -120 mV auf +40 mV für 200 ms alle 30 Sekunden vor und nach Ein- und Auswaschen von 1 mM MTSEA. MTSEA wurde nach Spur a appliziert. Zwischen Spur a und Spur b wurde das Pulsprotokoll gestoppt, MTSEA eingewaschen und für 3 Minuten im Bad belassen. Anschließend wurde MTSEA mit Na-Ri (Natrium-Ringer-Lösung) ausgewaschen und es wurde 2 Minuten gewartet, bis das Pulsprotokoll wieder gestartet wurde. Während des gesamten Waschvorganges wurden die Kanäle bei einem Membranpotential von -120 mV gehalten, um sicherzustellen, dass sie sich im geschlossenen Zustand befinden. B, Spitzenströme (I_{peak}) (in Nanoampere (nA)) der in (A) gezeigten (und weiteren) Spuren aufgetragen gegen die Zeit während der Messung. Die Bereiche über dem Schaubild (B) repräsentieren die sich jeweils im Bad befindliche Lösung während der aufgenommenen Stromspuren.

Die erste Spur nach Wiederaufnahme des Pulsprotokoll zeigte denselben Spitzenstrom wie vor dem Waschprozess (Abb. 8B). Im Gegenteil zum vorherigen Experiment, in welchem sich MTSEA während der Spannungspulse im Bad befand, konnte hier keine schnelle Stromabnahme während des ersten Spannungspulses beobachtet werden (Abb. 8A, Spur b). Auch die folgenden Spuren zeigten dieselben Charakteristika wie vor der Applikation von MTSEA, obwohl der Spitzenstrom nach Wiederaufnahme des Pulsprotokolls von Spur zu Spur ein wenig abnahm. Der Fakt, dass die erste Spur nach Wiederaufnahme des Pulsprotokolls in keiner Weise der Spur b in Abbildung 7C ähnelt und dass auch in den folgenden Spuren noch Strom aufgezeichnet werden konnte, deutet darauf

hin, dass der geschlossene Zustand des mutierten, wie auch des Wildtyp Kanals, nicht modifiziert werden kann. Die schnelle Stromabnahme während Spur b in Abbildung 7C muss demnach dem Effekt von MTSEA auf den offenen oder inaktivierten Zustand des *hKv1.3_V417C* Kanals zugeschrieben werden. Um zu untersuchen, ob MTSEA alleine den offenen und nicht den C-Typ inaktivierten Zustand des *V417C* mutierten Kanals modifizieren kann, wurden die in 4.1.3 beschriebenen Versuche durchgeführt.

4.1.3 Effekt von extrazellulär appliziertem MTSEA auf mutierte *hKv1.3_V417C* und mutierte *hKv1.3_H399T-V417C* Kanäle im offenen Zustand

Um herauszufinden, ob die in Abb. 6C,D beobachtete Stromabnahme auf den Effekt von MTSEA auf den offenen Zustand des mutierten Kanals und nicht auf den inaktivierten Zustand zurückzuführen ist, wurden die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche durchgeführt. Da während eines 200 ms andauernden Spannungspulses einige Kanäle in den C-Typ inaktivierten Zustand übergehen (vgl. 1.1.2) während andere im offenen Zustand verweilen, wäre es schwierig den MTSEA-Effekt auf den C-Typ inaktivierten oder auf den offenen Zustand zurückzuführen, weil sich beide Zustände überlagern. Daher wurden zwei Strategien verfolgt, um die C-Typ Inaktivierung während eines Spannungspulses zu vermindern, sodass sich die Kanäle dann hauptsächlich im offenen Zustand befinden. Einerseits wurden sehr kurze, nur 10 ms andauernde Pulse (siehe 4.1.3.1), angewendet. Andererseits wurde eine Doppelmutante, *hKv1.3_H399T-V417C*, verwendet (siehe 4.1.3.2).

4.1.3.1 Effekt von extrazellulär appliziertem MTSEA auf mutierte *hKv1.3_V417C* Kanäle im offenen Zustand

Um die Anzahl der Kanäle, die während eines 200 ms andauernden Spannungspulses in den C-Typ inaktivierten Zustand übergehen, zu minimieren, wurden nur 10 ms andauernde Spannungspulse gewählt. Während eines 10 ms andauernden Spannungspulses ist keine Stromabnahme zu erkennen (vgl. Abb. 9A, Spur a). Dies bedeutet, dass die Anzahl der Kanäle, die sich im C-Typ inaktivierten Zustand befinden, deutlich reduziert ist und dass dieses Pulsprotokoll

somit zur Charakterisierung des Effekts von MTSEA auf den offenen Zustand des Kanals herangezogen werden kann.

Die Induktion der Ströme erfolgte für dieses Experiment nach demselben Pulsprotokoll, dass bereits für Abb. 7C beschrieben wurde, allerdings wurde hier eine Pulslänge von 10 ms gewählt. Um diffusionslimitierende Effekte zu vermindern, wurde 1 mM MTSEA nach einem depolarisierenden Puls in das Bad eingewaschen und das Pulsprotokoll für drei Minuten angehalten, während das Membranpotential bei -120 mV gehalten wurde, um sicherzustellen, dass sich alle Kanäle im geschlossenen Zustand befinden, den MTSEA nicht modifizieren kann (s. 4.1.2.).

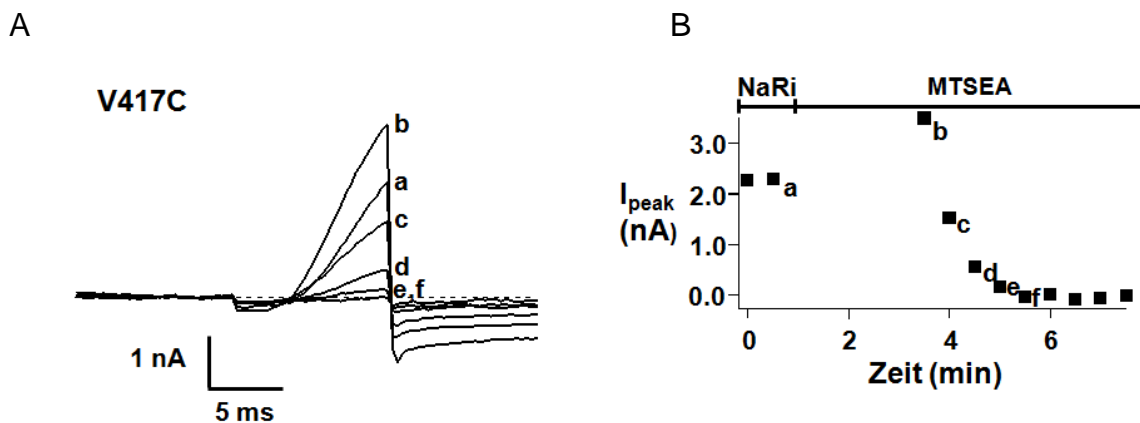


Abbildung 9: Effekt von extrazellulär appliziertem MTSEA (2-Aminoethyl Methanthiosulfonat Hydrobromid) auf Ströme durch mutierte *hKv1.3_V417C* Kanäle im offenen Zustand (Schmid S. I. and Grissmer S., 2011; Permission by Wiley). A, Die Induktion der Ströme erfolgte durch depolarisierende Pulse von einem Haltepotential von -120 mV auf +40 mV für 10 ms alle 30 Sekunden vor und nach Applikation von 1 mM MTSEA in die Badlösung. Zwischen Spur a und Spur b wurden keine Spannungspulse vorgegeben, MTSEA ins Bad eingewaschen und die Kanäle bei -120 mV im geschlossenen Zustand gehalten. B, Spitzenströme (I_{peak}) (in Nanoampere (nA)) der in (A) gezeigten (und weiteren) Spuren, aufgetragen gegen die Zeit während des Experimentes. Die Bereiche über dem Schaubild (B) repräsentieren die sich jeweils im Bad befindliche Lösung während der aufgenommenen Stromspuren. NaRi steht dabei für Natrium-Ringer-Lösung

Danach wurde das Spannungspulsprotokoll wieder aufgenommen und es zeigte sich, dass der Strom durch die *hKv1.3_V417C* Kanäle von Spur zu Spur abnahm (Abb. 9B), obwohl sich die Kanäle nicht im C-Typ inaktivierten Zustand befanden. Dies deutet darauf hin, dass eine Modifikation des offenen Zustandes möglich ist, ohne dass die Kanäle hierfür in den C-Typ inaktivierten Zustand übergehen

müssen. Um dies mit einer anderen Strategie zu bestätigen, wurden die in 4.1.3.2 beschriebenen Versuche durchgeführt.

4.1.3.2 Effekt von MTSEA auf *hKv1.3_H399T-V417C* Kanäle im offenen Zustand

Es ist bekannt, dass der nur eine Punktmutation tragende *hKv1.3_H399T* Kanal eine verminderte C-Typ Inaktivierung, verglichen mit dem Wildtyp-Kanal, aufweist (Rauer et al., 1996; Dreker et al., 2005). Um nun die C-Typ Inaktivierung im *hKv1.3_V417C* Kanal zu vermindern, wurde der doppelt mutierte *hKv1.3_H399T-V417C* Kanal verwendet, in der Hoffnung, dass dieser Kanal auch eine reduzierte C-Typ Inaktivierung zeigt. Um die Hypothese der verminderten C-Typ Inaktivierung dieses doppelt mutierten Kanal zu überprüfen, wurde die Inaktivierungszeitkonstante τ_h für den *hKv1.3_H399T-V417C* Kanal bestimmt, die einen Wert von 877 ± 98 ms (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=4$) für vier unabhängige Messungen aufwies und damit nahezu um einen Faktor 2,5 langsamer ist als die Inaktivierungszeitkonstante für den Wildtyp-Kanal (352 ± 38 ms, siehe 4.1.1.).

D.h. die *hKv1.3_H399T-V417C* Kanäle zeigen eine verminderte C-Typ Inaktivierung. Speziell auch die Erholung aus der Inaktivierung ist für diesen *hKv1.3_H399T-V417C* Kanal, verglichen mit dem Wildtyp und dem *hKv1.3_V417C* Kanal, viel schneller. Gibt man 10 Spannungspulse von einem Haltepotential von -120 mV auf +40 mV für 200 ms jede Sekunde vor, so haben sich nach diesen 10 Spannungspulsen 82 % der *hKv1.3_H399T-V417C* Kanäle (Abb. 10C) aus der Inaktivierung erholt, wohingegen sich nach derselben Zeit nur 12 % der *hKv1.3_V417C* (Abb. 10B) und nur 6 % der *hKv1.3 wt* Kanäle (Abb. 10A) aus der C-Typ Inaktivierung erholt haben. Auch diese Vorgehensweise (die Benutzung des *hKv1.3_H399T-V417C* Kanals) konnte daher als Modell für den Effekt von MTSEA auf den offenen Zustand verwendet werden, da der *hKv1.3_H399T-V417C* Kanal eine verminderte C-Typ Inaktivierung zeigte, aus der er sich auch wieder schneller erholen konnte.

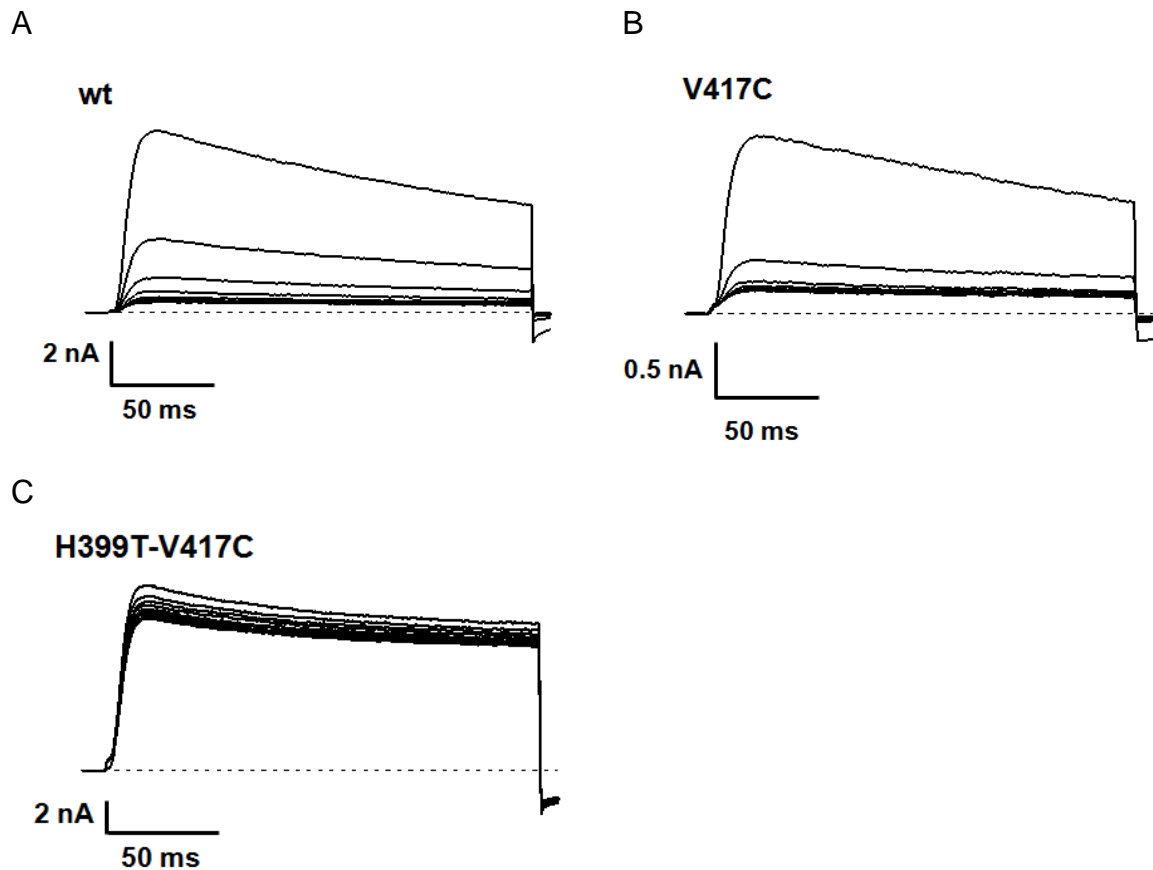


Abbildung 10: Erholung aus der Inaktivierung für *hKv1.3* wt (A), *hKv1.3_V417C* mutierte (B) und *hKv1.3_H399T-V417C* (C) mutierte Kanäle. A, B, C, Die Induktion der Ströme erfolgte nur in Anwesenheit von Na-Ri (Natrium-Ringer-Lösung) im Bad in der whole-cell Konfiguration der patch-clamp Technik durch 10 Spannungspulse von einem Haltepotential von -120 mV auf +40 mV für 200 ms jede Sekunde. Aufgrund der schnell aufeinander folgenden Pulse wurde in (A), (B), und (C) auf eine Leaksabstraktion verzichtet.

Im eigentlichen Experiment (Abb. 11 A,B) erfolgte die Induktion der Ströme durch den *hKv1.3_H399T-V417C* Kanal nach demselben Spannungspulsprotokoll, das bereits für Abb. 7C beschrieben wurde.

Um die diffusionslimitierenden Effekte möglichst gering zu halten, wurde 1 mM MTSEA ins Bad eingewaschen, nachdem das Pulsprotokoll angehalten wurde. Die Kanäle wurden dann für drei Minuten bei einem Membranpotential von -120mV im geschlossenen Zustand gehalten, der nicht von MTSEA modifiziert werden kann (vgl. 4.1.2). Danach wurde das Spannungspulsprotokoll wieder aufgenommen und es zeigte sich, dass der Strom durch die mutierten *hKv1.3_H399T-V417C* Kanäle während eines 200 ms andauernden Spannungspulses (Abb. 11A, Spur b), ähnlich dem Strom durch den nur eine Mutation tragenden *hKv1.3_V417C* Kanal in Abbildung 7C, Spur b, in Anwesenheit von MTSEA im Bad fast vollständig abgenommen hatte.

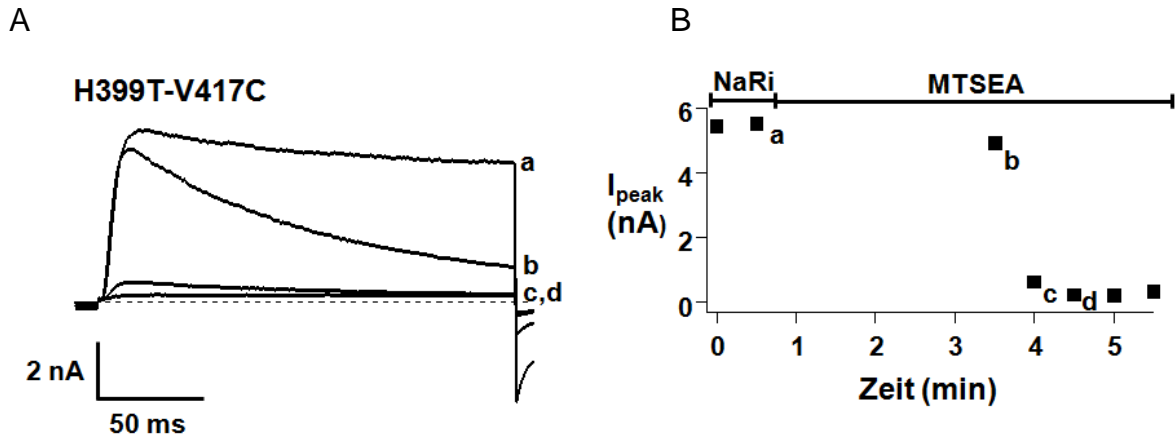


Abbildung 11: Effekt von extrazellulär appliziertem MTSEA (2-Aminoethyl Methanthiosulfonat Hydrobromid) auf Ströme durch mutierte *hKv1.3_H399T-V417C* im offenen Zustand (Schmid S. I. and Grissmer S., 2011; Permission by Wiley). A, Die Induktion der Ströme erfolgte durch depolarisierende Pulse von einem Haltepotential von -120 mV auf +40 mV für 200 ms alle 30 Sekunden vor und nach Applikation von 1 mM MTSEA in die Badlösung. Zwischen Spur a und Spur b wurden keine Spannungspulse vorgegeben, MTSEA ins Bad eingewaschen und die Kanäle bei -120 mV im geschlossenen Zustand gehalten. Bei den gezeigten Stromspuren wurde auf eine Leaksabtraktion verzichtet. B, Spitzenströme (I_{peak}) (in Nanoampere (nA)) der in (A) gezeigten Spuren (und weiteren), aufgetragen gegen die Zeit während des Experimentes. Die Bereiche über dem Schaubildern (B) repräsentieren die sich jeweils im Bad befindliche Lösung während der aufgenommenen Stromspuren. NaRi steht dabei für Natrium-Ringer-Lösung.

Die Tatsache, dass der Strom durch den *hKv1.3_H399T-V417C* Kanal abgenommen hatte, obwohl die C-Typ Inaktivierung in diesem Modell vermindert wurde, deutet darauf hin, dass der offene Zustand des *hKv1.3_V417C* Kanals modifiziert werden kann, ohne dass dieser Kanal hierfür in den C-Typ inaktivierten Zustand übergehen muss. Folglich führten beide Strategien (die 10 ms andauernden Pulse und die Verwendung des *hKv1.3_H399T-V417C* Kanals) zu demselben Ergebnis: Sie zeigten, dass eine Modifikation des offenen Zustandes des *hKv1.3_V417C* Kanals möglich ist.

Um herauszufinden, ob auch der C-Typ inaktivierte Zustand des V417C mutierten Kanals durch MTSEA modifiziert werden kann, wurden die 4.1.4 beschriebenen Versuche durchgeführt.

4.1.4 Effekt von MTSEA auf den mutierten *hKv1.3_V417C* Kanal im inaktivierten Zustand

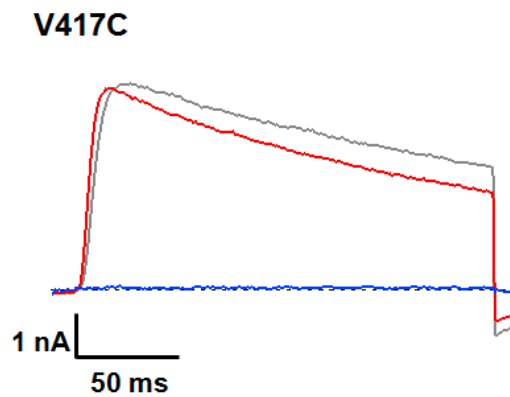
Um herauszufinden, ob das eingefügte Cystein an der Position 417 im mutierten Kanal im inaktivierten Zustand des Kanals für MTSEA zugänglich ist, wurde

MTSEA dem Bad zugefügt, während sich die Kanäle im C-Typ inaktivierten Zustand befanden.

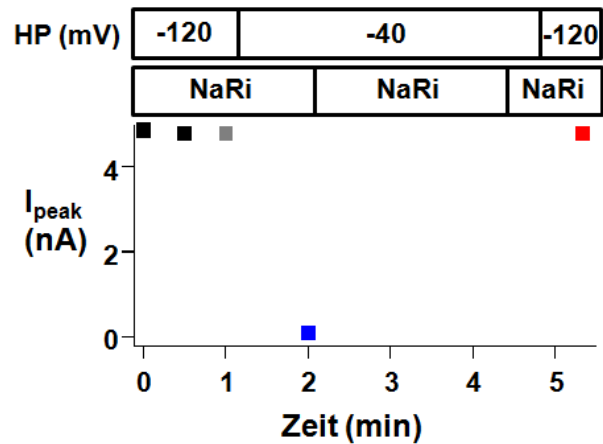
Zuerst wurde eine Kontrollmessung durchgeführt. Hierbei wurden sowohl dasselbe Messprotokoll als auch dieselbe Zelle wie in der eigentlichen Messung, während welcher MTSEA appliziert wurde, verwendet. Dieselbe Zelle wurde deshalb benutzt, um den direkten Unterschied beider Messungen, der auf die Applikation von MTSEA zurückzuführen sein muss, besser darstellen zu können. Die Ströme wurden in der whole-cell Konfiguration aufgenommen und ausgelöst durch Veränderung des Membranpotentials von einem Haltepotential von -120 mV auf +40 mV für 200 ms alle 30 Sekunden. Im Anschluss wurde das Pulsprotokoll gestoppt und das Membranpotential auf einen Wert von -40 mV verändert, um sicherzustellen, dass sich alle Kanäle im inaktivierten Zustand befanden. Nach einer einminütigen Wartezeit bei -40 mV wurde ein 200 ms Spannungspuls von -40 mV auf +40 mV ausgelöst. Dies resultierte aber nicht in einem Stromfluss durch die mutierten Kanäle (Abb. 12A, blaue Spur), was darauf hindeutete, dass sich alle Kanäle tatsächlich im inaktivierten Zustand befanden. Nach diesem Spannungspuls, der bestätigte, dass sich die Kanäle im inaktivierten Zustand befanden, wurde die Badlösung durch eine frische Na-Ri-Lösung ersetzt, die für zwei Minuten, in welchen das Membranpotential nicht verändert wurde, im Bad belassen wurde. Im Anschluss wurde erneut eine frische Na-Ri-Lösung in das Bad eingewaschen. Beide Waschschrte waren notwendig, um die gleiche Anzahl an Lösungswechseln im Kontrollexperiment wie auch im eigentlichen Experiment, in welchem anstatt NaRi MTSEA eingewaschen wurde, zu haben.

Kontrollmessung

A

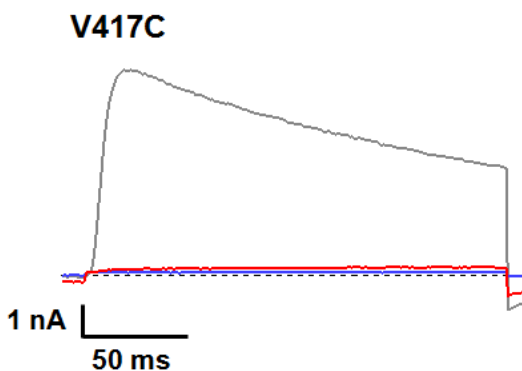


B



Messung mit MTSEA

C



D

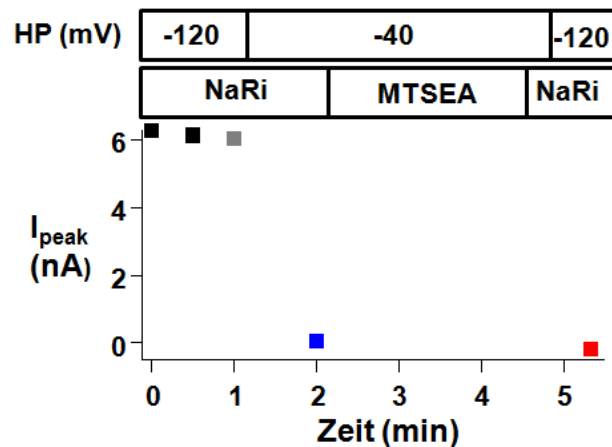


Abbildung 12: Effekt von extrazellulär appliziertem MTSEA (2-Aminoethyl Methanthiosulfonat Hydrobromid) auf mutierte *hKv1.3_V417C* Kanäle im inaktivierten Zustand (Schmid S. I. and Grissmer S., 2011; Permission by Wiley). A, C, Die Induktion der Ströme erfolgte in der whole-cell Konfiguration durch Spannungspulse von einem Haltepotential (HP) von -120 mV auf +40 mV für 200 ms alle 30 Sekunden. Nach der grauen Spur wurde das Membranpotential auf -40 mV gesetzt, um sicherzustellen, dass sich alle Kanäle im inaktivierten Zustand befinden und nach einer einminütigen Wartezeit wurde ein Spannungspuls von -40 mV auf +40 mV vorgegeben (blaue Spur). Nach der blauen Spur wurde die Badlösung durch eine frische Natrium-Ringer - Lösung (NaRi) (A) bzw. durch 1 mM MTSEA (C) ersetzt. Nach weiteren 2 Minuten wurde die Badlösung durch eine frische Na-Ri-Lösung ersetzt und nach dem Waschvorgang wurde das Haltepotential wieder auf -120 mV gesetzt. Von diesem Haltepotential wurde nach 20 Sekunden der nächste depolarisierende Puls durch Erhöhung des Membranpotentials auf +40 mV ausgelöst (rote Spur). B, C, Spitzenströme (I_{peak}) (in Nanoampere (nA)) der in (A) und (C) gezeigten Spuren (und weiteren) aufgetragen gegen die Zeit während der Messung. Aus Übersichtlichkeitsgründen sind die Lösungswechsel, sowie die Veränderungen des Haltepotentials in den Boxen über dem Schaubildern (B) und (D) ebenfalls dargestellt.

Nachdem der letzte Waschschrift beendet war, wurde das Membranpotential wieder auf einen Wert von -120 mV gesetzt, um die Kanäle aus dem inaktivierten Zustand in den geschlossenen Zustand zu überführen. 20 Sekunden nach Veränderung des Membranpotentials wurde ein weiterer Spannungspuls durch Erhöhung des Membranpotentials von diesem Haltepotential von -120 mV auf +40 mV ausgelöst.

Die dabei aufgenommene Spur (Abb. 12A, rote Spur) zeigte fast 100 % des Spitzenstromes der vor dem Waschvorgang aufgenommen wurde (Abb. 12A, graue Spur). Dies lässt darauf schließen, dass 20 Sekunden bei -120 mV für den Kanal ausreichend sind, um sich aus dem inaktivierten Zustand, hervorgerufen durch die Veränderung des Membranpotentials auf einen Wert von -40 mV, zu erholen.

Im eigentlichen Experiment mit MTSEA wurden dasselbe Pulsprotokoll als auch dieselben Lösungswechsel angewendet, die schon für das Kontrollexperiment beschrieben wurden. Aber anstatt, dass nach dem Spannungspuls von -40 mV auf +40 mV Na-Ri ins Bad eingewaschen wurde, wurde in diesem Experiment 1 mM MTSEA eingewaschen und für zwei Minuten in der Badlösung belassen, während das Membranpotential sich immer noch bei -40 mV befand. Um MTSEA aus dem Bad auszuwaschen wurde Na-Ri verwendet.

Die Spur vor dem Waschvorgang (Abb. 12C, graue Spur) zeigte dieselben Charakteristika wie die entsprechende Spur im Kontrollexperiment (Abb. 12A, graue Spur). Auch die Spuren, in welchen ein Spannungspuls von -40 mV auf +40 mV gesetzt wurde (Abb. 12A, blaue Spur und Abb. 12C, blaue Spur), entsprechen einander. Im Gegensatz zur Kontrollmessung, in welcher eine komplette Erholung aus der Inaktivierung, dargestellt durch den vorhandenen Strom durch die mutierten *hKv1.3_V417C* Kanäle, möglich war (Abb. 12A, rote Spur), konnten sich die im inaktivierten Zustand mit MTSEA behandelten *V417C* mutierten Kanäle nicht aus der Inaktivierung erholen (Abb. 12C, rote Spur), denn es konnte kein Strom beobachtet werden.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass MTSEA die sich im inaktivierten Zustand befindlichen, mutierten *hKv1.3_V417C* Kanäle modifizieren kann.

Die bisherigen Ergebnisse deuten also darauf hin, dass die extrazelluläre Applikation von MTSEA keinen Effekt auf *hKv1.3* wt Kanäle hat. In der *hKv1.3_V417C* Mutante wird der Strom hingegen durch MTSEA irreversibel

reduziert. Diese Modifikation des V417C mutierten Kanals ist nicht möglich, wenn sich der Kanal im geschlossenen Zustand befindet, wohingegen eine Modifikation des offenen, wie auch des C-Typ inaktivierten Zustandes möglich ist.

4.2 Inhibition der durch MTSEA hervorgerufenen Stromabnahme an *hKv1.3_V417C* mutierten Kanälen durch Applikation von Verapamil

In den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass extrazellulär appliziertes MTSEA zu einer irreversiblen Stromabnahme führt, wenn der V417C mutierte Kanal sich im offenen oder im inaktivierten Zustand befindet.

Da die Bindungsstelle von MTSEA vermutlich die Position 417 im mutierten Kanal ist und eine der Verapamil-Bindungsstellen im *hKv1.3* Kanal die Position 413 (Dreker et al., 2005) und somit in unmittelbarer Nähe zu Position 417 ist, stellte sich die Frage, ob die Applikation von Verapamil die durch MTSEA verursachte Stromabnahme verhindern kann. Um dieser Frage nachzugehen, wurde das im Folgenden beschriebene Experiment durchgeführt.

Die Ströme durch den *hKv1.3_V417C* mutierten Kanal wurden nach dem bereits für Abbildung 6A beschriebenen Pulsprotokoll induziert und alle Substanzen wurden zwischen zwei depolarisierenden Pulsen in die Badlösung eingewaschen. Nachdem ein Kontrollstrom aufgezeichnet wurde (Abbildung 13A, graue Spur), wurde 100 μM Verapamil in das Bad eingewaschen. Dies führte zu der für Verapamil typischen Stromabnahme: Einer Beschleunigung der Stromabnahme während des 200 ms depolarisierenden Pulses und zu einer Reduktion des Spitzenstromes bis ein neuer steady-state erreicht wird (Jacobs et al., 1990; DeCoursey, 1995; Rauer et al., 1996).

Nach Erreichen dieses steady-states (Abb. 13A, 2. rote Spur) wurde 1 mM MTSEA zusammen mit 100 μM Verapamil in das Bad eingewaschen und für 150 Sekunden dort belassen, da 90 Sekunden in Anwesenheit von MTSEA im Bad bereits ausreichend sind, um zu einer völligen Reduktion des Stromes durch *hKv1.3_V417C* mutierte Kanäle zu führen (vgl. Abb. 6D). In diesem Experiment konnte jedoch nur eine minimale Stromabnahme bedingt durch MTSEA, zusammen mit Verapamil, im Bad beobachtet werden (vgl. gelbe Spur in Abb. 13A

mit der 2. roten Spur in Abb. 13A). Eine völlige Blockade des Stromes innerhalb dieser 150 Sekunden konnte allerdings nicht detektiert werden.

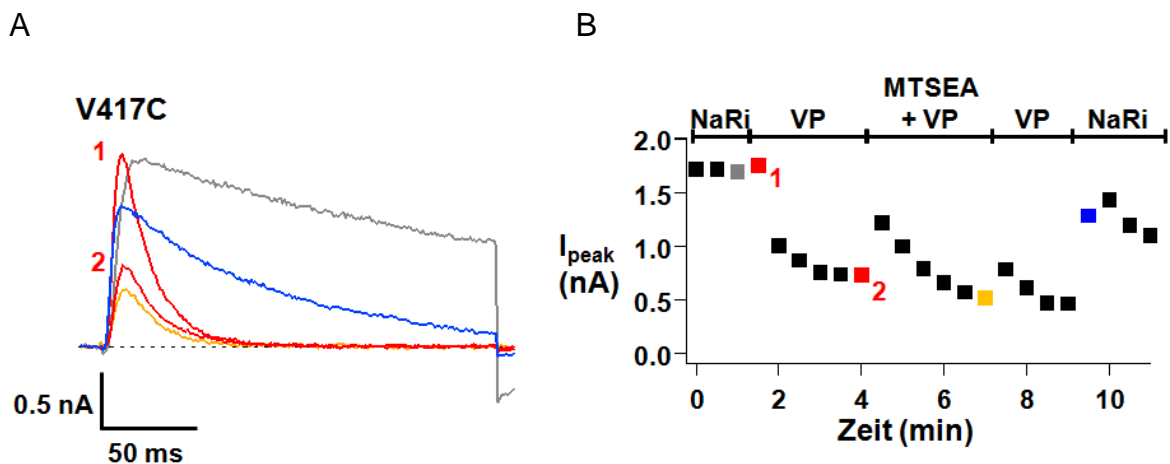


Abbildung 13: Inhibition der durch MTSEA (2-Aminoethyl Methanthiosulfonat Hydrobromid, 1 mM) hervorgerufenen Stromabnahme durch *hKv1.3_V417C* mutierte Kanäle durch Applikation von 100 μ M Verapamil (VP) (Schmid S. I. and Grissmer S., 2011; Permission by Wiley). A, Die Induktion der Ströme erfolgte durch Spannungspulse von einem Haltepotential von -120 mV auf +40 mV für 200 ms alle 30 Sekunden in An- und Abwesenheit der Substanzen (siehe die jeweiligen Bereiche über dem Schaubild (B)) 100 μ M Verapamil wurde zwischen der grauen und ersten roten Spur appliziert. Nach der 2. roten Spur wurde 1 mM MTSEA zusammen mit 100 μ M Verapamil dem Bad zugegeben. Die blaue Spur stellt die erste Spur nach dem Auswaschen beider Substanzen dar. B, Spitzenströme (I_{peak}) (in Nanoampere (nA)) der in (A) gezeigten (und anderen) Spuren aufgetragen gegen die Zeit während der Messung. Die Bereiche über dem Schaubild (B) repräsentieren die sich jeweils im Bad befindliche Lösung während der aufgenommenen Stromspuren. NaRi steht dabei für Natrium-Ringer-Lösung.

Im Anschluss wurde MTSEA zuerst mit 100 μ M Verapamil und dann mit Na-Ri aus dem Bad ausgewaschen. Der zusätzliche Waschschrift mit Verapamil war dabei notwendig, um sicherzustellen, dass auch während des Auswaschens von MTSEA genug Verapamil im Bad vorhanden war, um evtl. Konzentrationsverschiebungen beider Substanzen, bedingt durch das Auswaschen, zu vermeiden.

Nach Abschließen des kompletten Waschvorganges konnte in Anwesenheit von Na-Ri wieder Strom aufgenommen werden, was dafür spricht, dass Verapamil in der Lage war, MTSEA daran zu hindern an seine Bindungsstelle, das Cystein an Position 417 im mutierten Kanal, zu gelangen. Da wie in Abbildung 6D gezeigt, ein Auswaschen von MTSEA nach der Modifikation nicht möglich ist, muss die Erholung des Stromes auf den protektiven Effekt von Verapamil zurückzuführen sein.

Da Verapamil die Zellmembran passieren kann und von der intrazellulären Seite des Kanals wirkt (Rauer et al., 1996), wurde vermutet, dass MTSEA den Kanal auch modifizieren kann, wenn es von intrazellulär appliziert wurde. Dies würde wiederum bedeuten, dass extrazellulär verabreichtes MTSEA die Zellmembran passieren kann, die Bindungsstelle jedoch auf der intrazellulären Seite des Kanals ist. Um die Zugänglichkeit von MTS-Reagenzien zur Bindungsstelle zu untersuchen, wurden die im nächsten Kapitel beschriebenen Versuche durchgeführt.

4.3 Effekt von intrazellulär verabreichten MTS-Reagenzien auf den Strom durch mutierte *hKv1.3_V417C* Kanäle

Es ist bekannt, dass Verapamil, das den MTSEA-Effekt zu verhindern vermag (siehe 4.2), durch die Zellmembran diffundieren muss und von der Innenseite des Kanals wirkt (Rauer et al., 1996). Da die Bindungsstellen beider Substanzen in unmittelbarer Nähe zueinander liegen, habe ich vermutet, dass MTSEA ebenfalls durch die Membran diffundiert und von der Innenseite aus wirkt. Um dies zu bestätigen, wurden die im Folgenden beschriebenen Versuche gemacht.

4.3.1 Effekt von intrazellulär appliziertem MTSEA auf mutierte *hKv1.3_V417C* Kanäle

Um herauszufinden, ob MTSEA auch wirkt, wenn es von intrazellulär appliziert wird, wurde 1 mM MTSEA der Pipettenlösung hinzugefügt. Eine Konzentration von 1 mM wurde dabei aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit mit den bisher gemachten Experimenten, in welchen 1 mM MTSEA extrazellulär appliziert wurde (Abb. 6C,D und Abb. 7C,D), gewählt. Um diffusionslimitierende Effekte zu begrenzen, wurde, nachdem in die Zelle eingedrungen war und somit die whole-cell Konfiguration erreicht wurde, 6 Minuten gewartet, bis der erste Spannungspuls induziert wurde (Abb. 14B). Die *hKv1.3_V417C* mutierten Kanäle wurden dabei während der 6-minütigen Wartezeit bei einem Membranpotential von -120 mV im geschlossenen Zustand gehalten, der von MTSEA nicht modifiziert werden kann

(vgl. 4.1.2). Das Pulsprotokoll wurde nach der 6-minütigen Wartezeit in der whole-cell Konfiguration der patch-clamp Technik gestartet, wobei die Induktion der Ströme nach demselben Protokoll, das bereits für Abbildung 6A,C beschrieben ist, erfolgte.

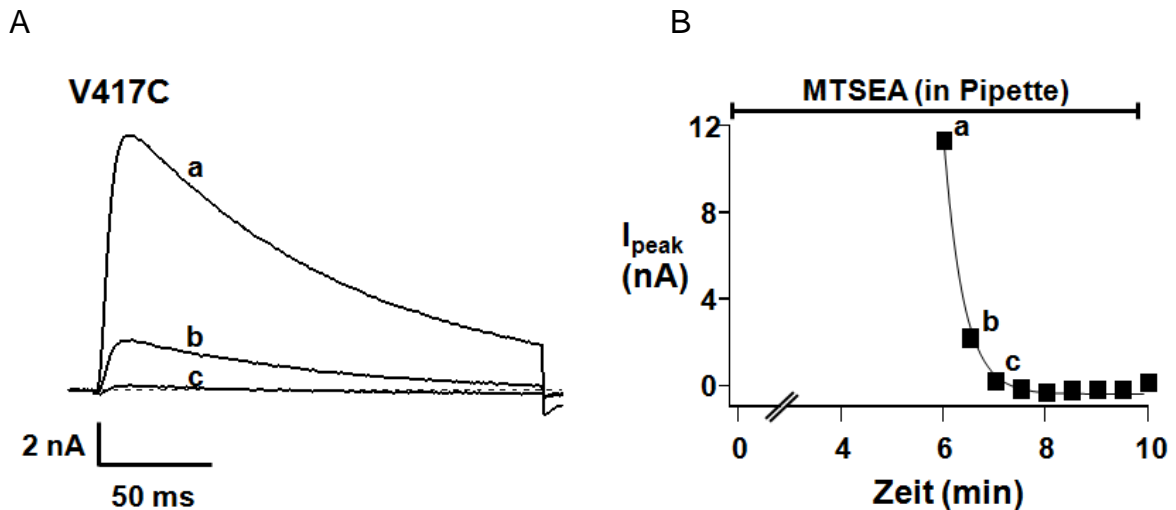


Abbildung 14: Effekt von intrazellulär appliziertem MTSEA (2-Aminoethyl Methanthiosulfonat Hydrobromid, 1 mM) auf Ströme durch *hKv1.3_V417C* mutierte Kanäle (Schmid S. I. and Grissmer S., 2011; Permission by Wiley). A, Die Induktion der Ströme erfolgte 6 Minuten nach dem Eindringen in die Zelle durch Spannungspulse von einem Haltepotential von -120 mV auf +40 mV für 200 ms alle 30 Sekunden in Anwesenheit von 1 mM MTSEA in der Pipette. B, Spitzenströme der in (A) gezeigten (und weiteren) Spuren aufgetragen gegen die Zeit nach dem Eindringen in die Zelle. Die durchgezogene Linie in (B) stellt die an die Datenpunkte angelegte Exponentialfunktion dar und hat eine Zeitkonstante von 19 Sekunden.

Die hier aufgezeichneten Spuren (Abb. 14A) ähnelten denjenigen in Abb. 7C, bei denen das Spannungspulsprotokoll für 3 Minuten angehalten und 1 mM MTSEA extrazellulär appliziert wurde.

Um die beobachtete Stromabnahme besser visualisieren zu können, wurde der Spitzenstrom der Spuren aus Abbildung 14A gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 14B) und es wurde eine Exponentialfunktion an die erhaltenen Datenpunkte angelegt. Die daraus erhaltene Zeitkonstante für intrazellulär appliziertes MTSEA zeigte dabei einen Wert von 16 ± 3 Sekunden (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=3$) für 3 unabhängige Messungen.

Die Stromreduktion während der depolarisierenden Pulse ähnelte, wie bereits erwähnt, der Stromabnahme des in Abbildung 7C (Spur b) beschriebenen Experimentes, in welchem MTSEA extrazellulär appliziert wurde und das

Pulsprotokoll für drei Minuten angehalten wurde. Die Tatsache, dass eine Stromreduktion auch beobachtet werden konnte, wenn MTSEA intrazellulär verabreicht wurde, deutet darauf hin, dass auch intrazellulär verabreichtes MTSEA in der Lage war den mutierten *hKv1.3_V417C* Kanal zu modifizieren und dass die mögliche Bindungsstelle für MTSEA an der intrazellulären Seite des Kanals sein könnte. Um herauszufinden, ob die Bindungsstelle für MTS-Reagenzien von der intra- oder extrazellulären Seite des Kanals zugänglich ist, wurden geladene MTS-Reagenzien (das positiv geladene MTSET und das negativ geladene MTSES) verwendet. Denn es könnte ja sein, dass intrazellulär verabreichtes MTSEA nur wirkte, weil es durch die Zellmembran diffundierte und von der extrazellulären Seite wirkte. Da geladene MTS-Reagenzien die Zellmembran jedoch nicht passieren können und somit nur den Kanal modifizieren können, wenn sie von der richtigen und somit zugänglichen Seite des Kanals appliziert werden, wurden für die folgenden Versuche diese geladenen MTS-Reagenzien verwendet.

Die extrazelluläre Applikation von MTSET und MTSES reduzierte dabei den Strom durch die *V417C* mutierten Kanäle nur unwesentlich. Während der ersten 5 Minuten nach Applikation führte extrazellulär verabreichtes MTSET zu einer Stromreduktion von lediglich 29 % gegenüber dem Spitzenstrom vor MTSET Gabe (Daten nicht gezeigt) und die extrazelluläre Applikation von MTSES führte zu einer Stromreduktion um 25 % gegenüber dem Spitzenwert vor MTSES-Gabe (Daten nicht gezeigt). Beide Stromreduktionen sind, verglichen mit der extrazellulären Applikation von MTSEA (Abb. 6C,D), nur unwesentlich, denn in Abb. 6C,D reichten bereits 90 Sekunden aus, um den Strom durch die *V417C* mutierten Kanäle vollständig zu reduzieren, sodass ein Wert nahe null erreicht wurde. Dieses Ergebnis deutete somit darauf hin, dass die Bindungsstelle für MTSET und MTSES nicht von der extrazellulären Seite des Kanals aus erreicht werden konnte. Um herauszufinden, ob die intrazelluläre Applikation von MTS-Reagenzien zu einer Stromabnahme führt, was darauf hindeuten würde, dass die Bindungsstelle für MTS-Reagenzien an der intrazellulären Seite des Kanals ist, wurden die in 4.3.2. beschriebenen Experimente durchgeführt.

4.3.2 Effekt von intrazellulär appliziertem MTSET und MTSES auf *hKv1.3* Wildtyp und *hKv1.3_V417C* mutierte Kanäle

Um herauszufinden, ob intrazellulär verabreichte, geladene MTS-Reagenzien, den *hKv1.3_V417C* mutierten Kanal modifizieren können, wurden die im Folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt.

Zunächst wurde eine Kontrollmessung am Wildtyp Kanal durchgeführt. Dazu wurden 5 mM des positiv geladenen MTSETs intrazellulär verabreicht. Die Induktion der Ströme erfolgte in der whole-cell Konfiguration der patch-clamp Technik durch Spannungspulse von einem Haltepotential von -120 mV auf +40 mV für 200 ms alle 30 Sekunden. Um diffusionslimitierende Effekte zu begrenzen, wurde, nachdem in die Zelle eingedrungen war, 10 Minuten gewartet, bis der erste Spannungspuls induziert wurde. Das Membranpotential wurde während dieser 10 Minuten konstant bei -120 mV gehalten, um sicherzustellen, dass sich die Kanäle im geschlossenen Zustand befinden, der von MTSEA nicht modifiziert werden kann (vgl. 4.1.2). Während der ersten 10 Minuten nach Beginn des Spannungspulsprotokoll, konnte dabei keine wesentliche Abnahme des Stromes, bedingt durch intrazellulär appliziertes MTSET, durch die Wildtyp Kanäle beobachtet werden (vgl. Abb. 15A,B).

Dieses Ergebnis ist in Einklang mit dem für Abbildung 6A,B erhaltenen Ergebnis, bei dem 1 mM MTSEA extrazellulär verabreicht wurde und dies am Wildtyp Kanal zu keiner wesentlichen Stromabnahme führte. D.h. sowohl MTSEA, als auch das positiv geladene MTSET können den wt *hKv1.3* Kanal nicht modifizieren.

Um zu untersuchen, ob intrazellulär verabreichtes MTSET den mutierten *hKv1.3_V417C* Kanal modifizieren kann, wurde dasselbe Protokoll, sowie MTSET in derselben Konzentration wie für Abb. 15A,B beschrieben, benutzt. Mit Aufnahme des Spannungspulsprotokolls, konnte eine Stromreduktion beobachtet werden, die der Stromabnahme in Abb. 14A, in welcher MTSEA intrazellulär appliziert wurde, ähnelt.

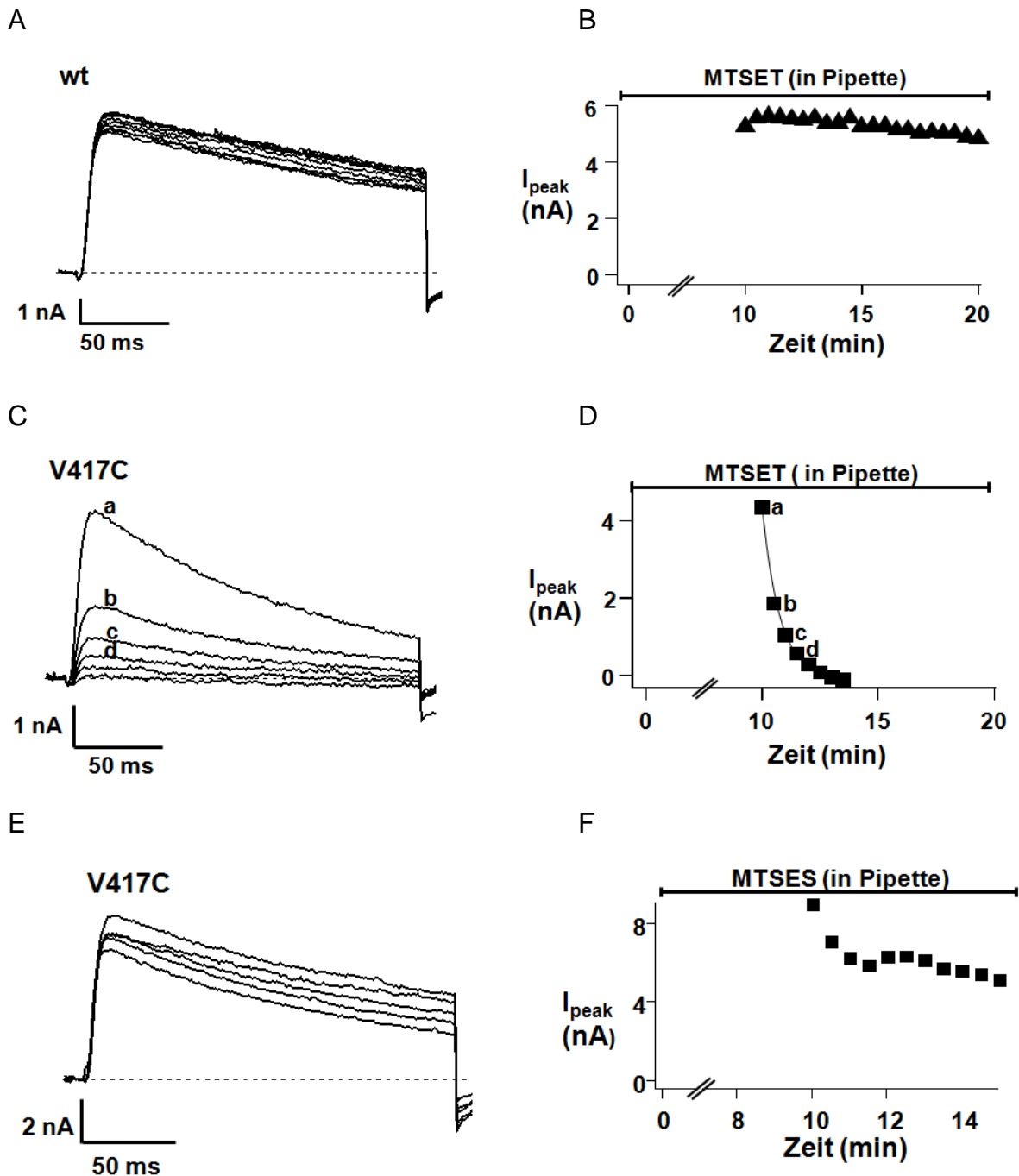


Abbildung 15: Effekt von intrazellulär appliziertem MTSET ([2-(Trimethylammonium)ethyl]methanthiosulfonat Bromid, 5 mM) und MTSES (Natrium (2-Sulfonatoethyl)methanthiosulfonat, 5 mM) auf Ströme durch *hKv1.3* wt (A,B) und *hKv1.3_V417C* mutierte (C,D,E,F) Kanäle (Schmid S. I. and Grissmer S., 2011; Permission by Wiley). A, C, E Die Induktion der Ströme erfolgte 10 Minuten nach dem Eindringen in die Zelle durch Spannungspulse von einem Haltepotential von -120 mV auf +40 mV für 200 ms alle 30 Sekunden in Anwesenheit von 5 mM MTSET bzw. 5 mM MTSES in der Pipette. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist in (A) und (E) nur jede 2. Spur gezeigt. B, D, F, Spitzenströme (I_{peak}) (in Nanoampere (nA)) der in (A), (C) und (E) gezeigten Spuren (und weiteren) aufgetragen gegen die Zeit nach dem Eindringen in die Zelle. Die durchgezogene Linie in (D) stellt die an die Datenpunkte angelegte Exponentialfunktion dar und hat eine Zeitkonstante von 41 s.

Um diese Stromabnahme besser darstellen zu können wurde an Abbildung 15D eine Exponentialfunktion angelegt, aus der die Zeitkonstante für intrazellulär appliziertes MTSET abgelesen werden konnte. Diese betrug 45 ± 19 Sekunden (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=5$) für 5 unabhängige Experimente. Der Wert dieser Zeitkonstante ist nahezu um einen Faktor 3 langsamer, als der Wert für die Zeitkonstante für intrazellulär verabreichtes MTSEA, für die ich einen Wert von 16 Sekunden erhielt (vgl. 4.3.1). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass intrazellulär verabreichtes MTSET zwar den Strom durch die mutierten *hKv1.3_V417C* Kanäle modifizieren kann, jedoch dabei nicht so effizient ist, wie intrazellulär verabreichtes MTSEA.

In einem nächsten Schritt wurde das negativ geladene MTSES verwendet und es wurde zunächst am Wildtyp Kanal ein Kontrollexperiment durchgeführt. Dazu wurden 5 mM dieses negativ geladenen MTSESs intrazellulär verabreicht. Diese intrazelluläre Applikation von MTSES führte am Wildtyp Kanal zu keiner wesentlichen Stromabnahme (Daten nicht gezeigt) und die Spuren ähnelten den Stromspuren in Abb. 15A,B, in welcher MTSET am Wildtyp Kanal intrazellulär verabreicht wurde.

Im Anschluss wurde geprüft, ob intrazellulär appliziertes MTSES den *hKv1.3_V417C* mutierten Kanal modifizieren kann. Dafür wurde dasselbe Protokoll wie bereits für Abbildung 15A,B angewendet. Jedoch wurden hier anstatt MTSET 5 mM des negativ geladenen MTSESs intrazellulär verabreicht. Die aufgenommen Stromspuren nach Aufnahme des Spannungspulsprotokolls und in Anwesenheit von 5 mM MTSES in der Pipette zeigten keine wesentliche Stromreduktion (Abb. 15E,F). Nach fünf Minuten konnten noch 70 % des Spitzenstromes des ersten Pulses nach Starten des Pulsprotokolles aufgezeichnet werden, wohingegen 1 Minute für intrazellulär verabreichtes MTSEA bzw. 2,5 Minuten für intrazellulär verabreichtes MTSET ausreichten, um den Strom durch die *V417C* mutierten Kanäle vollständig zu reduzieren, sodass kein Strom mehr aufgezeichnet werden konnte. Dieses Ergebnis deutet folglich darauf hin, dass intrazellulär appliziertes MTSES kaum einen Effekt auf *hKv1.3_V417C* mutierte Kanäle hat, die Gründe hierfür werden in der Diskussion ausführlicher besprochen und haben nicht unbedingt etwas mit der Zugänglichkeit der Bindungsstelle von intrazellulär zu tun. Der Fakt jedoch, dass das intrazellulär verabreichte und nicht membrangängige MTSET, den Strom durch die *hKv1.3_V417C* mutierten Kanäle reduzieren konnte,

wohingegen bei extrazellulärer Applikation von MTSET eine solche Stromreduktion nicht beobachtet werden konnte, spricht eindeutig dafür, dass die Bindungsstelle für MTS-Reagenzien nur von intrazellulär aus zugänglich ist.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob extra- und/oder intrazellulär verabreichte MTS-Reagenzien den Wildtyp *hKv1.3* Kanal als auch den mutierten *hKv1.3_V417C* Kanal modifizieren können und welche Zustände des mutierten Kanals für MTS-Reagenzien zugänglich sind. Es wurde gezeigt, dass sowohl die extrazelluläre Applikation von MTSEA als auch die intrazelluläre Applikation von MTSEA und MTSET zu einer drastischen Stromabnahme am V417C mutierten Kanal führten, wohingegen die intra- und extrazelluläre Applikation von MTSES nicht zu einer solchen Stromabnahme führte. Die durch MTSEA hervorgerufene Modifikation des *hKv1.3_V417C* Kanals war nur möglich, wenn der Kanal sich im offenen oder inaktivierten Zustand befand. Eine Modifikation des geschlossenen Zustandes war nicht möglich

Am Wildtyp Kanal führte die Applikation von MTS-Reagenzien dagegen zu keiner drastischen Stromabnahme, was darauf hindeutet, dass alle natürlich im *hKv1.3* wt Kanal vorkommenden Cysteine, speziell dasjenige an Position 412, d.h. in unmittelbarer Nähe von Position 417, von MTS-Reagenzien nicht modifiziert werden können oder dass eine Modifikation zwar möglich ist, sich jedoch nicht in einer Stromreduktion äußert. Ein Grund weshalb MTS-Reagenzien das Cystein an Position 412 nicht modifizieren können ist, dass die Seitenkette dieses Cysteins nicht in die Pore hineinragt und somit für eine Interaktion mit MTS-Reagenzien nicht zur Verfügung steht. Ein weiterer Grund wäre, dass die Pore an dieser Stelle, die näher am Selektivitätsfilter ist als Position 417, zu eng ist, sodass ein MTS-Molekül nicht hineinpasst.

5.1 MTS-Reagenzien wirken von der intrazellulären Seite des *hKv1.3_V417C* Kanals

Die extra- und intrazelluläre Applikation von MTSEA führte an *hKv1.3_V417C* Kanälen zu einer drastischen Stromabnahme (Abb. 6C,D; Abb. 14A,B; Abb. 15C,D), was darauf hindeutet, dass das eingefügte Cystein an der Position 417 von MTS-Reagenzien modifiziert werden kann. Da auch ein Auswaschen von MTSEA mit einer Na-Ri Lösung den Strom durch den mutierten Kanal nicht

wiederherstellen konnte (Abb. 6D), gehe ich davon aus, dass diese Stromreduktion bzw. die Modifikation des Cysteins an Position 417 irreversibel ist. Eine solche, irreversible Stromreduktion wurde schon von Xue et al. (2002) für HCN Kanäle beschrieben und ist vermutlich auf die kovalente Bindung von MTSEA an die Thiolgruppe des Cysteins zurückzuführen.

Von MTSEA ist bekannt, dass es in seiner deprotonierten Form die Zellmembran passieren kann (Karlín et al., 1998) und war daher für die Charakterisierung der Zugänglichkeit der Bindungsstelle für MTS-Reagenzien (Position 417 im V417C mutierten Kanal) nicht geeignet. Daher wurde das ständig positiv geladene MTSET (Karlín et al., 1998) verwendet, das die Zellmembran nicht passieren kann und es zeigte sich, dass MTSET den *hKv1.3_V417C* Kanal nur modifizieren konnte, wenn es intrazellulär verabreicht wurde (Abb. 15C,D), aber nicht wenn es extrazellulär appliziert wurde (Daten nicht gezeigt). Daraus schlussfolgerte ich, dass die MTS-Bindungsstelle nur von intrazellulär zugänglich ist und dass extrazellulär verabreichtes MTSEA über die Zellmembran in das Innere der Zelle diffundieren muss, um dann von intrazellulär zu wirken. Ein ähnlicher Wirkmechanismus wurde für das membran-permeable Verapamil gezeigt, indem das eine zusätzliche Methylgruppe tragende N-methyl-Verapamil verwendet wurde, das aufgrund seiner ständig vorhandenen positiven Ladung die Zellmembran nicht passieren kann, weshalb angenommen wurde, dass extrazellulär verabreichtes Verapamil über die Zellmembran diffundieren muss, um seine intrazelluläre Bindungsstelle zu erreichen (Rauer et al., 1996). Betrachtet man sich beide Moleküle (Verapamil und N-methyl-Verapamil) näher, so erkennt man, dass beide ein zentrales Stickstoffatom tragen, von dem angenommen wird, dass es den Ionenfluss durch die Pore blockiert (Wulff et al., 2009). Auch MTSEA, das entweder neutral oder durch Aufnahme eines zusätzlichen Protons positiv geladen sein kann, sowie das eine zusätzliche Methylgruppe tragende und daher ständig positiv geladene MTSET besitzen ein solches Stickstoffatom. Daher denke ich, dass das sowohl in MTSEA als auch in MTSET vorkommende Stickstoffatom den Ionenfluss blockiert, weshalb nach der Modifikation kein Strom durch den V417C mutierten Kanal mehr aufgenommen werden konnte (vgl. Abb. 6C,D). Im MTSES Molekül hingegen befindet sich kein Stickstoffatom. Dieses fehlende Stickstoffatom ist eventuell der Grund, weshalb MTSES am *hKv1.3_V417C* Kanal zu keiner Modifikation bzw. zu keiner wesentlichen

Stromreduktion, verglichen mit der Stromreduktion bei MTSEA oder intrazellulärer MTSET-Gabe, führte.

Des Weiteren könnte die unwesentliche Stromreduktion bei intrazellulärer Applikation von MTSES an *hKv1.3_V417C* Kanälen in der unterschiedlichen Wirksamkeit der verschiedenen MTS-Reagenzien begründet sein: Einfache Thiole können von MTSES schlechter modifiziert werden als von MTSEA oder MTSET (Stauffer et al., 1994). Auch könnte die Ladung des MTSES-Moleküls eine Rolle spielen. Es ist negativ geladen und könnte von den natürlich im Kanal vorkommenden negativen Ladungen abgeschirmt worden sein, sodass es seine Bindungsstelle nicht erreichen konnte. Um dies auszuschließen, wurde die Distanz zwischen dem Cystein an Position 417 und allen bei neutralem pH negativ geladenen Aminosäuren (Glutaminsäure und Asparaginsäure) unter Benutzung des 3-D Modell des *hKv1.2* Kanals (pdb-File 2A79, Long et al., 2005) bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass in einem Umkreis von 16 Å von der Aminosäure an Position 417 keine negativen Ladungen im Kanal zu finden sind. Jedoch zeigte sich auch, dass es eine Aminosäure (Glu 343) am intrazellulären Eingang des Kanals gibt, die eine negative Ladung trägt, weshalb es denkbar ist, dass diese Aminosäure das MTSES-Molekül elektrostatisch abgestoßen hat, sodass es nicht passieren und zu seiner Bindungsstelle gelangen konnte. Ein weiterer Grund könnte sein, dass das MTSES-Molekül zu groß oder einfach zu unflexibel ist, um in die Pore zu passen und mit dem Cystein an Position 417 zu interagieren. Obwohl diese Möglichkeit nicht sehr wahrscheinlich ist, denn MTSES ist kleiner als MTSET (Akabas et al., 1992) und MTSET passte in die Pore hinein und führte zu einer Modifikation (Abb. 15C,D). Auch könnte es sein, dass MTSES zwar zu einer Modifikation führte, diese sich aber nicht in einer Stromreduktion äußerte, weil das Stickstoffatom in diesem Molekül fehlt (siehe oben).

Obwohl ich keine der oben genannten Möglichkeiten für die nicht zu beobachtende Stromreduktion bei MTSES-Gabe ausschließen kann, denke ich, dass die Aminogruppe wichtig für die Stromreduktion ist, weil diese Aminogruppe eben auch verantwortlich dafür ist, dass Verapamil den Strom durch Kv Kanäle reduzieren kann.

5.2 MTS-Reagenzien können den geschlossenen Zustand des *hKv1.3_V417C* mutierten Kanals nicht modifizieren

Die Messungen, in denen der Effekt von MTSEA auf *hKv1.3* Kanäle im geschlossenen Zustand (s. 4.1.2) näher charakterisiert werden sollte, zeigten, dass MTSEA die *hKv1.3* Wildtyp sowie die mutierten *hKv1.3_V417C* Kanäle im geschlossenen Zustand nicht modifizieren kann, da nach der 3-/5- minütigen Pause der Spitzenstrom durch die Wildtyp (Abb. 7A,B) bzw. V417C mutierten (Abb. 7C,D; Abb. 8A,B) Kanäle nicht abgenommen hatte. Im *Shaker*-Kanal wurden schon ähnliche Messungen gemacht, um die Position des „activation gates“ zu bestimmen. Liu et al. (1997) fügten ebenfalls Cysteine in den *Shaker*-Kanal ein und prüften deren Zugänglichkeit. Dabei stellte sich heraus, dass Cysteine, die auf der intrazellulären Seite des „activation gates“ positioniert sind (Position 482-486 im *Shaker*; *hKv1.3* Position 432-436) im geschlossenen als auch im offenen Zustand modifiziert werden können, wohingegen Aminosäuren, die näher am Selektivitätsfilter, also auf der extrazellulären Seite des Aktivierungsgates (Position 470 bzw. 474-477 im *Shaker*; Position 420 bzw. 424-427 im *hKv1.3* Kanal) sind, nur im offenen und nicht im geschlossenen Zustand von MTSEA modifiziert werden können. In einem weiteren Schritt zeigten die Autoren, dass Tetrabutylammonium, ein Offenkanalblocker, die Modifikation verhindern kann, weshalb die Autoren davon ausgingen, dass zumindest die Aminosäuren an den Position 470 und 474 (*hKv1.3* Position 420 und 424) hinter einem Tor, dem sog. „activation gate“ liegen müssen. Dieses Gate schwingt auf, wenn der Kanal aktiviert und vom geschlossenen in den offenen Zustand übergeht und ist geschlossen, wenn sich der Kanal im geschlossenen Zustand befindet. Ist dieses Gate geschlossen, kann MTSEA nicht durchtreten und die Aminosäuren, die sich hinter diesem Gate bzw. näher am Selektivitätsfilter befinden (Position 470 bzw. 474-477 im *Shaker*), sind vor einer Modifikation geschützt. Übertragen auf dieses Modell, würde sich das von mir im *hKv1.3* Kanal eingefügte Cystein an der Position 417, im *Shaker* Kanal an der Position 467 befinden, d.h. verglichen mit der Position 470 (*hKv1.3* Position 420) ist dies näher am Selektivitätsfilter bzw. weiter weg in Richtung extrazellulär bezogen auf das Aktivierungsgate. Daher gehe ich davon aus, dass das von mir eingefügte Cystein an der Position 417 im *hKv1.3* Kanal im geschlossenen Zustand durch das geschlossene „activation gate“

vor einer Modifikation geschützt ist. Nur wenn dieses „activation gate“ aufschwingt, d.h. wenn der Kanal sich öffnet, kann MTSEA in die Pore eintreten und das sich dort befindliche Cystein an der Position 417 im *hKv1.3_V417C* Kanal modifizieren.

5.3. MTS-Reagenzien können Kanäle, die sich im offenen oder C-Typ inaktivierten Zustand befinden, modifizieren

In Abbildung 12C,D sollte der Einfluss von MTSEA auf den inaktivierten Zustand des mutierten *hKv1.3_V417C* Kanals untersucht werden. Nach Wiederaufnahme konnte, im Gegensatz zum Kontrollexperiment (Abb. 12A,B), kein Strom mehr durch diesen Kanal fließen, was darauf hindeutet, dass MTSEA den inaktivierten Zustand des *hKv1.3_V417C* Kanals modifizieren kann. Auch der offene Zustand des *hKv1.3_V417C* Kanals kann durch MTSEA modifiziert werden (vgl. Abb. 9A,B und Abb. 11A,B) und in 5.2 wurde gezeigt, dass das „activation gate“ auf der intrazellulären Seite des Kanals dabei offen ist. Die Tatsache, dass nun nicht nur der offene, sondern auch der inaktivierte Zustand des *hKv1.3_V417C* Kanals von MTSEA modifiziert werden kann, ohne dass der Kanal dabei in den offenen Zustand übergeht, hat auch Konsequenzen auf, die Position des „activation gates“ während der C-Typ Inaktivierung und auf die Zugänglichkeit der Seitenkette des Cysteins an der Position 417 im *hKv1.3_V417C* Kanal. Cuello et al. (2010) zeigten durch Kristallisation des bakteriellen KcsA Kanals, dass das „activation gate“ auch während der C-Typ Inaktivierung zur Seite schwingt und somit offen ist. In 5.2 wurde gezeigt, dass dieses „activation gate“ im geschlossenen Zustand des Kv1.3 Kanals geschlossen ist, es jedoch zur Seite schwingt, wenn sich der Kanal öffnet, sodass MTSEA passieren kann und eine Modifikation möglich ist. Bezogen auf die C-Typ inaktivierten Zustand bedeutet dies, dass dieses „activation gate“ auch zur Seite schwingen muss, wenn der Kanal sich im C-Typ inaktivierten Zustand befindet, denn anders ist die beobachtete Modifikation des inaktivierten Zustandes nicht zu erklären. MTSEA musste folglich das „activation gate“, das auch offen ist, wenn der Kanal inaktiviert ist, passiert und dann das Cystein an der Position 417, hinter dem „activation gate“, modifiziert haben. Meine Daten bestätigen somit das Modell von Cuello et al. (2010). Cuello et al. (2010) zeigten außerdem, dass S6 als Teil dieses „activation gates“ (vgl. Abb. 3B) während der

Aktivierung als auch der Inaktivierung immer weiter nach außen schwingt. Da in meinem Fall eine Modifikation des inaktivierten Zustandes des *hKv1.3* Kanals möglich war, bedeutet dies, dass die von Cuello et al. (2010) vorgeschlagene Bewegung von S6 nicht eine Bewegung der Seitenkette des Cysteins an der Position 417 beinhaltet. Zumindest nicht in einer Weise, dass diese Seitenkette nicht mehr in die Pore ragt. Würde diese Seitenkette nämlich nicht mehr in die Pore ragen, könnte MTSEA sie auch nicht mehr modifizieren.

5.4 Verapamil verhindert die durch MTSEA hervorgerufenen Modifikation der *hKv1.3_V417C* Kanäle

Die MTSEA-Bindungsstelle im mutierten Kanal ist in unmittelbarer Nähe zu einer der Verapamil-Bindungsstellen (Position 413 im *hKv1.3* Kanal, Dreker et al., 2005). Von Verapamil ist bekannt, dass es sowohl den offenen als auch den inaktivierten Zustand blockieren kann. In Abbildung 13A,B wurde nun gezeigt, dass Verapamil MTSEA daran hinderte den *hKv1.3* Kanal zu modifizieren. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für mutierte *Shaker*-Kanäle erhalten. Hier konnte Tetrabutylammonium, ein Offenkanalblocker, die Cysteine an den Positionen 470 und 474 (*hKv1.3* Positionen 420 und 424) vor einer MTSEA Modifikation schützen (Liu et al., 1997). Die Tatsache, dass nun Verapamil MTSEA daran hinderte an seine Bindungsstelle zu gelangen, bedeutet nun, dass Verapamil zumindest teilweise die Seitenkette des Cysteins an der Position 417 im *hKv1.3_V417C* Kanal überdeckt haben muss, sodass diese Seitenkette für eine Modifikation mit MTSEA nicht mehr zur Verfügung stand. Dies würde auch erklären, warum in Abbildung 13A nach Auswaschen aller Substanzen (Abb. 13A, blaue Spur) nicht dieselbe Stromamplitude wie in der Kontrollspur (Abb. 13A, graue Spur) aufgenommen werden konnte. Verapamil blockierte nicht alle Kanäle, denn in der zweiten roten Spur (Abb. 13A) konnte noch ein geringer Strom durch die Kanäle fließen, d.h. einige Kanäle waren nicht durch Verapamil vor einer MTSEA Modifikation geschützt und konnten folglich von MTSEA modifiziert werden. Durch einmal modifizierte Kanäle kann auch nach Auswaschen von MTSEA kein Strom mehr fließen (vgl. Abb. 6C,D), diese modifizierten Kanäle fehlten somit in der blauen Spur in Abbildung 13A. Für die Bindungsstellen beider

Substanzen (Verapamil und MTSEA) bedeutet dieses Ergebnis nun, dass sie überlappend sein müssen.

5.5. Interaktionsmodell von MTS-Reagenzien mit dem Cystein in *hKv1.3_V417C* Kanälen

Um die Interaktion von MTS-Reagenzien mit dem eingefügten Cystein besser visualisieren zu können, erstellte ich ein Modell (Abb. 16), das, stellvertretend für die MTS-Reagenzien, ein MTSEA-Molekül im Kanal zeigt.

Das dreidimensionale MTSEA-Molekül wurde mit dem Dundee Prodrug2 Server (A. W. Schuettelkopf and D. M. F. van Aalten (2004), PRODRG - a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes, Acta Crystallographica D60, 135--1363) erstellt und als pdb Datei gespeichert.

Als Modell für den mutierten *hKv1.3* Kanal wurden die Kristallisationsdaten des *hKv1.2* Kanals (pdb-Datei 2A79, Long et al., 2005) verwendet. Dabei wurden die β -Untereinheit, sowie die t1-Domäne aus Übersichtlichkeitsgründen mithilfe des Programmes Swiss-PDB Viewer entfernt, sodass nur noch die α -Untereinheit des Kanals vorhanden war. Außerdem wurden, ebenfalls aus Gründen der Übersichtlichkeit, die Transmembranhelices S1 bis S4 sowie alle Seitenketten der Aminosäuren, bis auf die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen 412 und 417, entfernt. In dieses Kanalmodell wurde dann die erstellte pdb-Datei des MTSEA-Moleküls hineingeladen. Dabei wurde das MTSEA-Molekül in die unmittelbare Nähe der Seitenkette der Aminosäure an Position 417 gebracht.

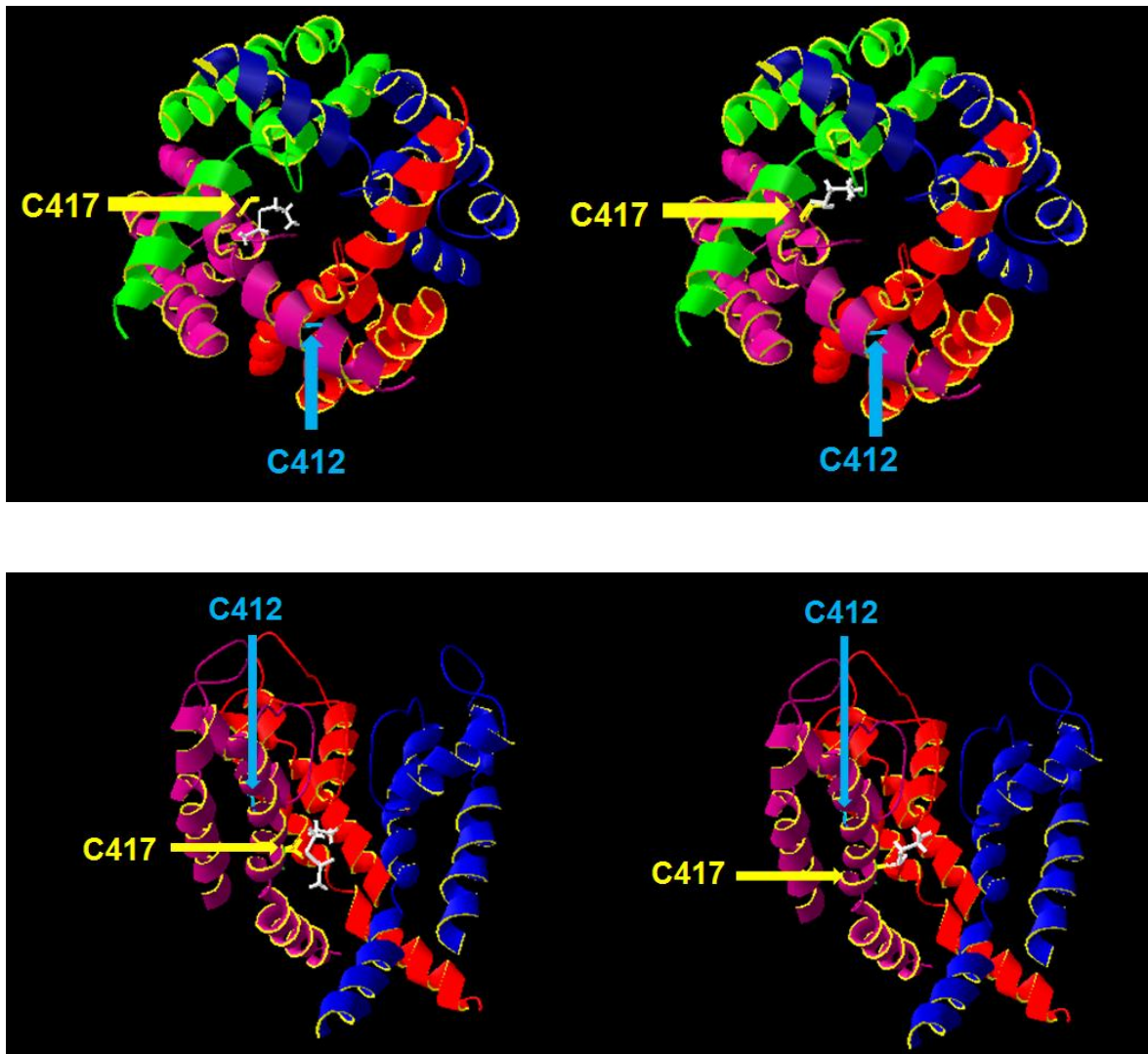


Abbildung 16: Dreidimensionales Modell des mutierten *hKv1.3_V417C* Kanals (die Kristallisationsdaten des *hKv1.2* Kanals [pdb-Datei 2A79] wurden als Modell benutzt) mit den Transmembranhelices S5 und S6 (Schmid S. I. and Grissmer S., 2011; Permission by Wiley). Jede Untereinheit ist in einer anderen Farbe dargestellt (grün, rot, blau, magenta). Oben: Blick von der intrazellulären Seite des Kanals durch die Pore. Unten: seitlicher Blick auf den Kanal. Die extrazelluläre Seite zeigt nach oben und die intrazelluläre Seite zeigt nach unten. Die Seitenketten der Aminosäuren sind mit Ausnahme der Seitenkette der Aminosäure an der Position 417 (gelb, Pfeil) nicht gezeigt. Das MTSEA (2-Aminoethyl Methanthiosulfonat Hydrobromid)-Molekül ist vor (links) und nach (rechts) der Modifikation in weiß dargestellt. Die Sulfinsäure, die sich nach der Modifikation bildet (vgl. Abb. 5), ist nicht gezeigt.

Abbildung 16 zeigt nun diesen Kanal einmal von der intrazellulären (oben) Seite sowie von der Seite (unten). Links (Abb. 16) erkennt man ein MTSEA-Molekül in unmittelbarer Nähe zur Aminosäure an der Position 417 und rechts (Abb. 16) ist die kovalente Bindung zwischen der Aminosäure und dem MTSEA-Molekül dargestellt. Aus der linken, oberen Abbildung (Abb. 16) ist ersichtlich, dass im

Kanal noch Platz für drei weitere MTSEA-Moleküle wäre, die dann mit dem Cystein an der Position 417 interagieren könnten. Da MTSEA eine kovalente Bindung mit diesen Cysteinen eingeht (Abb. 5) könnte es durchaus sein, dass nach Modifikation der Cysteine aller vier Untereinheiten des Kanals die zentrale Pore durch MTSEA verstopft ist und daher keine Ionen mehr passieren können, was sich in der irreversiblen Stromreduktion äußert (Abb. 6C,D). Zudem ist aus Abbildung 16 ersichtlich, dass die Aminosäure an der Position 412 nicht in die Pore ragt. Dies könnte daher einer der Gründe sein, weshalb die Applikation von MTSEA an den Wildtyp-Kanälen nicht zu einer schnellen Stromabnahme (Abb. 6A,B), verglichen mit den mutierten *hKv1.3_V417C* Kanälen, führte; MTSEA konnte das Cystein an der Position 412 einfach nicht modifizieren, weil die Seitenkette nicht in die Pore ragt und daher für MTSEA nicht zugänglich ist.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Methanthiosulfonat (MTS)-Reagenzien auf Ströme durch *hKv1.3* Wildtyp und mutierte *hKv1.3_V417C* Kaliumkanäle untersucht. Im Verlauf der Arbeit zeigten sich dabei die folgenden Ergebnisse und Schlussfolgerungen:

1. MTS-Reagenzien führen am Wildtyp Kanal zu keiner wesentlichen Stromreduktion und somit Modifikation, wohingegen der *hKv1.3_V417C* Kanal schnell durch MTS-Reagenzien modifiziert wird. Dies bedeutet, dass die Seitenkette des natürlich vorkommenden Cysteins an der Position 412 im Wildtyp-Kanal entweder nicht in die Pore ragt oder die Pore an dieser Stelle zu eng ist, sodass MTS-Moleküle darin keinen Platz haben.
2. Um mehr über die Bewegung des „activation gates“ zu erfahren, wurde untersucht, welche Zustände des *hKv1.3_V417C* Kanals von MTSEA (2-Aminoethyl Methanthiosulfonat Hydrobromid) modifiziert werden können. Dabei zeigte sich:
 - a) MTSEA kann den geschlossenen Zustand des mutierten Kanals nicht modifizieren.
 - b) MTSEA kann den offenen Zustand des Kanals modifizieren, ohne dass der Kanal dafür in den inaktivierten Zustand übergehen muss.
 - c) Auch der C-Typ inaktivierte Zustand kann durch MTSEA modifiziert werden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das „activation gate“ auf der intrazellulären Seite des Kanals sowohl im offenen als auch im C-Typ inaktivierten Zustandes des *hKv1.3* Kanals zur Seite schwingt, dass jedoch die Bewegung von S6 während der Inaktivierung nicht eine Bewegung der Seitenkette des Cysteins an der Position 417 beinhaltet, sodass diese Seitenkette nicht mehr in die Pore ragt.

3. Verapamil konnte die durch MTSEA hervorgerufene Modifikation des *hKv1.3_V417C* Kanals verhindern, weshalb ich davon ausgehe, dass beide Substanzen überlappende Bindungsstellen haben.
4. MTS-Reagenzien wirken von der intrazellulären Seite des Kanals und das membranpermeable MTSEA muss, wenn es extrazellulär appliziert wird, die Zellmembran passieren, um von der intrazellulären Seite des Kanals wirken zu können.

Die vorliegende Arbeit gab Aufschluss über die Position des „activation gates“ während der C-Typ Inaktivierung sowie über die Position der Aminosäure an der Position 417 während dieser Inaktivierung. Sie lieferte somit erste Hinweise auf die Bewegung der Aminosäure an Position 417 während der C-Typ Inaktivierung. In einem weiteren Schritt müssten andere Aminosäuren der Transmembranhelix S6 untersucht werden, um die dreidimensionale Struktur dieses C-Typ inaktivierten Zustand weiter zu charakterisieren. Das gewonnene Wissen könnte dann in der Zukunft für die rationale Entwicklung eines Medikamentes, das diesen C-Typ inaktivierten Zustand stabilisiert, benutzt werden. Ein potentiell Einsatzgebiet eines solchen Medikamentes wäre zum Beispiel in der Therapie von Autoimmunerkrankungen oder Multipler Sklerose zu sehen.

7. Literaturverzeichnis

1. Akabas M. H., Stauffer D. A., Xu M., Karlin A. (1992). Acetylcholine Receptor Channel Structure Probed in Cysteine-Substitution Mutants, *Science*, **258**:307-310.
2. Akabas M. H., Kaufmann C., Archdeacon P., Karlin A. (1994): Identification of Acetylcholine Receptor Channel-Lining Residues in the Entire M2 Segment of the α Subunit, *Neuron*, **13**:919-927
3. Beeton C., Pennington M. W., Wulff H., Singh S., Nugent D., Crossley G., Khaytin I., Calabresi P. A., Chen C., Gutman G. A., Chandy K. G. (2005): Targeting Effector Memory T Cells with a Selective Peptide Inhibitor of Kv1.3 Channels for Therapy of Autoimmune Diseases, *Molecular Pharmacology*, **67**:1369–1381
4. Cahalan M. D., Chandy K. G. (1997): Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression, *Current Opinion in Biotechnology*, **8**:749-756
5. Choi K. L., Aldrich R. W., Yellen G. (1991): Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K^+ channels, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**:5092-5095
6. Coleman S. K., Newcombe J., Pryke J., Dolly J. O. (1999): Subunit Composition of Kv1 Channels in Human CNS, *Journal of Neurochemistry*, **73**:849-858
7. Cuello L. G., Jogini V., Cortes D. M., Perozo E. (2010). Structural Mechanism of C-type inactivation in K^+ channels, *Nature*, **446**: 203-209.
8. DeCoursey T. E. (1995): Mechanism of K^+ Channel Block by Verapamil and Related Compounds in Rat Alveolar Epithel Cells, *The Journal of General Physiology*, **106**: 745-779

9. del Camino D., Holmgren M., Liu A. Yellen G.(2000): Blocker protection in the pore of a voltage-gated K⁺ channel and its structural implications, *Nature*, **403**:321-325
10. Delisle B. P., Anson B. D., Rajamani S., January C. T. (2004): Biology of Cardiac Arrhythmias Ion Channel Protein Trafficking, *Circulation Research*, **94**:1418-1428
11. Dime D. S., Toronto Research Chemicals Inc.,: Methanethiosulfonate Reagents: Application to the Study of Protein Topology and Ion Channels, Application Note
12. Doyle D. A., Cabral J. M., 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
13. Dreker T., Grissmer S. (2005): Investigation of the Phenylalkylamine Binding Site in *hKv1.3* (H399T), a Mutant with a Reduced C-type Inactivated State, *Molecular Pharmacology*, **68**:966-973
14. Fanger C. M., Rauer H., Neben A. L., Miller M. J., Raueri H., Wulff H., Rosa J. C., Ganellin C. R., Chandy K. G., Cahalan M. D. (2001): Calcium-activated Potassium Channels Sustain Calcium Signaling in T Lymphocytes, *The Journal of Biological Chemistry*, **276**:12249–12256
15. Grissmer S., Cahalan M. (1989): TEA prevents inactivation while blocking open K⁺ channels in human T lymphocytes, *Biophysical Journal*, **55**:203-206
16. 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, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**:9411-9415

17. Gutman G. A., Chandy G. K., Adelman J. P., Aiyar J., Bayliss D. A., Clapham D. E., Covarrubias M., Desir G. V., Furuichi K., Ganetzky B., Garcia M. L., Grissmer S., Jan L. Y., Karschin A., Kim D., Kuperschmidt S., Kurachi Y., Lazdunski M., Lesage F., Lester H. A., Mckinnon D., Nichols C. G., O'Kelly I., Robbins J., Robertson G. A., Rudy B., Sanguinetti M., Seino S., Stuehmer W., Tamkun M. M., Vandenberg C. A., Wei A., Wulff H., Wymore R. S. (2003): International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Potassium Channels, *Pharmacological Reviews*, **55**:583-586
18. Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sackmann B., Sigworth F. J. (1981): Improved Patch-Clamp Techniques for High Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches, *Pflügers Archiv*, **391**: 85-100
19. Heginbotham L., Lu Z., Abramson T., MacKinnon R. (1994): Mutations in the K⁺ Channel Signature Sequence, *Biophysical Journal*, **66**:1061-1067
20. Holmgren M., Soon Shin K., Yellen G. (1998): The Activation Gate of a Voltage-Gated K⁺ Channel Can Be Trapped in the Open State by an Intersubunit Metal Bridge, *Neuron*, **21**:617–621
21. Jacobs E. R., DeCoursey T. E. (1990): Mechanisms of potassium channel block in rat alveolar epithelial cells, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **255**:459-472
22. Jäger H., Rauer H., Nguyen A. N., Aiyar J., Chandy K. G., Grissmer S. (1998): Regulation of mammalian Shaker-related K⁺ channels: evidence for non-conducting closed and non-conducting inactivated states, *Journal of Physiology*, **506.2**:291-301
23. Karlin A., Akabas M. H. (1998): Substituted-Cysteine Accessibility Method, *Methods in Enzymology*, **293**:123-145
24. Kiss L, Korn S. J. (1998): Modulation of C-Type Inactivation by K⁺ at the Potassium Channel Selectivity Filter, *Biophysical Journal*, **74**:1840–1849

25. Liu Y., Jurman M. E., Yellen G. (1996): Dynamic Rearrangement of the Outer Mouth of a K⁺ Channel during Gating, *Neuron*, **16**:859-867.
26. Liu Y., Holmgren M., Jurman M. E., Yellen G. (1997): Gated Access to the Pore of a Voltage-Dependent K⁺ Channel, *Neuron*, **19**:175–184
27. Long S. B., Campbell E. B., MacKinnon R. (2005): Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling, *Science*, **309**:903-908
28. López-Barneo J., Hoshi T., Heinemann S. H., Aldrich R. W. (1993): Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels, *Receptors and Channels*, **1**:61-71
29. Perozo E., Santacruz-Tolozá L., Stefani E., Bezanilla F., Papazian D. M. (1994): S4 Mutations Alter Gating Currents of Shaker K Channels, *Biophysical Journal*, **66**:345-354
30. Rauer H., Grissmer S. (1996): Evidence for an Internal Phenylalkylamine Action on the Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.3, *Molecular Pharmacology*, **50**:1625-1634
31. Riordan J. R., Rommens J. M., Kerem B.-S., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J.-L., Drumm M. L., Iannuzzi M. C., Collins F. S., Tsui L.-C. (1989): Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA, *Science*, **245**:1066-1073
32. Schmid S. I., Grissmer S., (2011): Effect of verapamil on the action of methanethiosulfonate reagents on human voltage-gated Kv1.3 channels: implications for the C-type inactivated state, *British Journal of Pharmacology*, **163(3)**:662-674

33. Stauffer D. A., Karlin A. (1994): Electrostatic Potential of the Acetylcholine Binding Sites in the Nicotinic Receptor Probed by Reactions of Binding-Site Cysteines with Charged Methanethiosulfonates, *Biochemistry* , **33**:6840-6849
34. Tombola F., Pathak M. M., Isacoff E. Y. (2005): How Far Will You Go to Sense Voltage?, *Neuron*, **48**:719-725
35. Tombola F., Pathak M. M., Gorostiza P., Isacoff E. Y. (2007): The twisted ion-permeation pathway of a resting voltage-sensing domain, *Nature*, **445**:546-549
36. Vicente R., Escalada A., Villalonga N., Texidó L., Roura-Ferrer M., Martín-Satué M., López-Iglesias C., Soler C., Solsona C., Tamkun M. M., Felipe A. (2006): Association of Kv1.5 and Kv1.3 Contributes to the Major Voltage-dependent K⁺ Channel in Macrophages, *The Journal Of Biological Chemistry*, **281**:37675–37685
37. Wulff H., Castle N. A., Pardo L. A. (2009): Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets, *Nature Reviews Drug Discovery*, **8**:982-1001.
38. Xue T., Li R. A. (2002): An External Determinant in the S5-P Linker of the Pacemaker (HCN) Channel Identified by Sulfhydryl Modification, *The Journal of Biological Chemistry*, **48**:46233–46242
39. Yang N., George A. L., Jr., Horn R. (1996): Molecular Basis of Charge Movement in Voltage-Gated Sodium Channels, *Neuron*, **16**:113–122
40. Yellen G., Sodickson D., Chen T. , Jurman M. E.(1994): An Engineered Cysteine in the External Mouth of a K⁺ Channel Allows Inactivation to Be Modulated by Metal Binding, *Biophysical Journal*, **66**:1068-1075
41. Yellen G. (1998): The moving parts of voltage-gated ion channels, *Quarterly Reviews of Biophysics* 31:239-295
42. Yellen G. (2002): The voltage-gated potassium channels and their relatives, *Nature*, **419**:35-42

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stephan Grissmer für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit die Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Besonders bedanken möchte ich mich hierbei für die ständige Diskussionsbereitschaft und die, für das praktische Vorgehen, oft sehr guten Ratschläge, die unermüdliche Geduld in der Beantwortung aller Fragen sowie für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Außerdem möchte ich mich bei der Leiterin des Instituts für Angewandte Physiologie, Frau Prof. Dr. Birgit Liss sowie beim Leiter der Division Neurophysiologie, Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Frank Lehmann-Horn für deren Unterstützung sowie für die Unterstützung durch deren Mitarbeiter bedanken.

Mein Dank geht auch an die Internationale Graduiertenschule in Ulm für das großzügige Stipendium im Rahmen des Promotionsprogrammes „Experimentelle Medizin“ für diese Doktorarbeit. Die von der Graduiertenschule angebotenen Seminare, im Besonderen das Seminar für das Promotionsprogramm, waren stets ein Anstoß zum kritischen Überdenken wissenschaftlicher Arbeiten.

Bei den ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Stephan Grissmer möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Arbeitsatmosphäre sowie für die Hilfsbereitschaft bedanken. Im Besonderen möchte ich mich dabei bei Frau Azadeh Nikouee für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft sowie die vielen kritischen Diskussionen und Anregungen und für ihre nette und freundliche Art bedanken. Außerdem möchte ich mich bei Frau Katharina Ruff für die Versorgung der Zellen, sowie für ihren hilfsbereiten Charakter bedanken. Bei Dr. Sylvia Prütting und bei Dr. Tobias Dreker möchte ich mich für die Bereitstellung der Plasmide für die mutierten Kanäle bedanken. Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Sylvia Prütting und Mohamed Quader für die gute Zusammenarbeit bedanken. Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Angewandte Physiologie und der Division Neurophysiologie, bedanken, die mir bei technischen Fragestellungen und Problemen stets behilflich waren.

Bei all meinen Freunden möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung sowie die nötige Abwechslung vom Laboralltag bedanken.

Mein besonderer und wichtigster Dank geht an meine Eltern, Heinz und Sylvia Schmid, die mir eine universitäre Ausbildung und somit auch diese Doktorarbeit

erst ermöglicht haben. Des Weiteren möchte ich mich bei ihnen dafür bedanken, dass sie stets an mich geglaubt und mich in allen Lebenslagen, im Besonderen beim Anfertigen dieser Doktorarbeit, unterstützt haben.

Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen entfernt.

Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen entfernt.

Publikationen

Schmid S. I., Grissmer S., (2011): Effect of verapamil on the action of methanethiosulfonate reagents on human voltage-gated Kv1.3 channels: implications for the C-type inactivated state, *British Journal of Pharmacology*, **163(3)**:662-674