

**NMR-spektroskopische und biochemische
Charakterisierung der Tetramerisierungsdomäne des
spannungsgesteuerten Kaliumkanals K_v1.4 und ihrer
Interaktionen mit den N- und C-terminalen cytosolischen
Domänen des Kanalproteins**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN
FAKULTÄT III - BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT
REGENSBURG

vorgelegt von

Christina Schreier

aus Beverungen

Regensburg
Dezember 2006

Promotionsgesuch eingereicht am: 12. 12. 2006

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Wirth

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

2. Gutachter: Prof. Dr. Richard Warth

3. Prüfer: Prof. Dr. Reinhard Sterner

Inhalt:

1	Einleitung	1
1.1	Ionenkanalproteine	1
1.2	Die Hauptklassen der Kaliumkanäle	2
1.2.1	Allgemeiner Aufbau	2
1.3	Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle: Die Identifizierung der K _v -Kanäle	4
1.3.1	Der Klassische Ball und Chain Mechanismus nach Armstrong	4
1.3.2	Typischer Aufbau der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle	5
1.3.3	Die Unterfamilien der K _v -Familie und ihre Nomenklatur	7
1.3.4	Allgemeine Kanalfunktion der K _v -Kanäle	9
1.4	Strukturbestimmung bei K _v -Kanalproteinen	10
1.4.1	Die Transmembran-Domäne	11
1.4.2	Das Selektivitätsfilter: Signatursequenz und Schlüssel zur Kanalfunktion	12
1.4.3	Der Kanalöffnungsmechanismus	14
1.4.4	Der Spannungssensor und seine Funktion	15
1.4.5	K _v 1.2: Ein shaker-ähnlicher Kaliumkanal des Menschen	16
1.5	Die Intrazellulären Domänen und ihre Funktionen	16
1.5.1	Die Tetramerisierungs Domäne (T1)	17
1.5.2	Das Inaktivierungspeptid und seine Funktion	21
1.5.3	C-Terminus : PDZ Bindedomäne und weitere mögliche Funktionen	22
1.5.4	Inaktivierungsmechanismen: N- und C-Typ Inaktivierung	23
1.5.5	Lokalisation und Funktion ausgewählter K _v 1 und K _v 3 Kanäle	24
1.6	Stand der Forschung	25
1.7	Proteinfaltung	27
1.8	NMR Spektroskopie an Proteinen	28
1.9	Zielsetzung der Arbeit	29
2	Materialien und Methoden	31
2.1	Materialien und Geräte	31
2.1.1	Geräte	31

2.1.2	Chemikalien	32
2.1.3	Wichtige Verbrauchsmaterialien	32
2.1.4	Fertigsäulen und Säulenmaterial für die Proteinreinigung	32
2.1.5	Proteinstandards	33
2.2	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	33
2.2.1	Puffer-Stammlösungen	33
2.2.2	Puffer für Ni-NTA System	34
2.2.3	Rückfaltungspuffer	34
2.2.4	Sonstige Stammlösungen	35
2.3	Materialien und Medien für die Proteinexpression	35
2.3.1	<i>E. coli</i> Stämme	35
2.3.2	Kulturmedien	35
2.4	Molekularbiologische Materialien und Methoden	37
2.5	Proteinbiochemische Standardmethoden	37
2.5.1	SDS-PAGE nach Shägger & von Jagow und Nativgele	37
2.5.2	Größenausschlusschromatographie	38
2.5.3	Proteinbestimmung nach Bradford	38
2.5.4	CD-Spektroskopie	39
2.5.5	Ultrafiltration	39
2.6.1	Kriterien für die Optimierung der Proteinexpression	39
2.6.2	Übersicht über die Expressionbedingungen der Konstrukte	40
2.7	Proteinreinigung, Rückfaltung und Löslichkeitsscreening	41
2.7.1	Reinigungsprotokoll für K _v His-Tag Konstrukte	41
2.7.1.1	Denaturierende Aufreinigung durch Ni-NTA Affinitätschromatographie	41
2.7.1.2	Rückfaltung der K _v Konstrukte	42
2.7.1.3	Kontinuierliche Dialyse	43
2.7.1.4	Nachreinigung und Umpuffern mittels Gelfiltration	43
2.7.2	Thrombinverdau und Nachreinigung des IP-Konstrukts	44
2.7.3	Bestimmung der geeigneten Pufferbedingungen im Keuzscreening-Verfahren	44
2.8	Weitere Methoden	46
2.8.1	D ₂ O Recycling Protokoll	46
2.9	NMR-Spektroskopische Methoden	47
2.9.1	Zusammensetzung der NMR-Proben	47

2.9.2	Spektren und Pulsprogramme	47
2.9.3	Titrationsexperimente	49
2.10	Software und Datenbanken	49

3 Ergebnisse **51**

3.1	Die K_v3.4 Konstrukte 165H und 153H	51
3.1.1	Expression und Aufreinigung des K _v 3.4 165H Konstrukts	52
3.1.2	Genaue Charakterisierung der Löslichkeit von K _v 3.4 165H	53
3.1.2.1	pH-Wert	53
3.1.2.2	Ionenstärke des Puffers und weitere Zusätze	54
3.1.2.3	Einfluss von Zink auf die Löslichkeit und Rückfaltung	54
3.1.3	Optimierung der Rückfaltung des 165H Konstrukts	55
3.1.3.1	Abschließende Aufreinigung des Zielproteins durch Größenausschlusschromatographie	56
3.1.4	NMR-Spektren zur Bewertung der Pufferbedingungen	57
3.1.5	TROSY HSQC-Spektren des ¹⁵ N markierten 165H Konstrukts	58
3.1.6	Analytische Gelfiltration: Nachweis der Tetramerisierung	60
3.1.7	Nachweis der Multimere über Diffusionsmessung	62
3.1.8	Zusammenfassung der Ergebnisse der K _v 3.4 Konstrukte	62
3.2	Das K_v1.4 Konstrukt K_v1.4 T1K	63
3.2.1	Optimierung der Pufferbedingungen	64
3.2.2	Untersuchung des Oligomerisierungszustands von K _v 1.4T1K	65
3.2.2.1	Analytische Gelfiltration	66
3.2.2.2	Stabilität der NMR-Probe	68
3.2.2.3	Diffusionsmessungen	68
3.2.3	Vorbereitungen für das sequentielle Assignment von K _v 1.4 T1K	69
3.2.3.1	Optimierung der Proteinexpression	70
3.2.3.2	Optimierung der Rückfaltausbeute des T1K Konstrukts	71
3.2.3.3	Entwicklung eines Recyclingverfahrens für D ₂ O aus Kulturmedien	72
3.2.3.4	Herstellung dreifach isotopenmarkierter NMR Proben des K _v 1.4 T1K Konstrukts	72
3.2.3.5	Aufnahme der 3D Spektren	73
3.2.4	Das sequentielle Assignment von K _v 1.4T1K	74
3.2.4.1	Problemfälle bei der Zuordnung der Signale	75

3.2.4.2	Verbesserung der Zuordnung durch weitere NMR-Spektren	76
3.2.4.3	Überprüfung der Qualität der Zuordnung	76
3.2.4.4	Abgleich mit Spektren mit bekannter Zuordnung	78
3.2.5	Vorbereitung der Titrationsexperimente mit den cytoplasmatischen Domänen von K _v 1.4	79
3.2.5.1	Das K _v 1.4 IP Konstrukt	79
3.2.5.2	Das K _v 1.4 C-Terminus Konstrukt	81
3.2.5.3	Erstellung eines Homologiemodells für das K _v 1.4 T1 Tetramer	82
3.2.6	Titrationsexperimente: Interaktionen von K _v 1.4 T1K mit den cytosolischen Domänen	83
3.2.6.1	Durchführung der Experimente	83
3.2.6.2	Auswertung der Titrationsexperimente	84
3.2.6.3	Titration des K _v 1.4 T1K Konstrukts mit dem K _v 1.4 Inaktivierungspeptid	85
3.2.6.4	Überprüfung der Auswertung	88
3.2.6.5	Darstellung der Ergebnisse am Homologiemodell	89
3.2.6.6	Titration des IP mit der T1-Domäne	91
3.2.6.7	Titration mit dem C-Terminus Konstrukt K _v 1.4 C84	92
3.2.6.8	Kombinierte Titration mit C-Terminus und Inaktivierungspeptid	95
3.2.6.9	Zusammenfassung der Ergebnisse der Titrationsexperimente	97
3.2.7	Weitere Experimente zur Interaktion des K _v 1.4 T1K Konstrukts mit dem Inaktivierungspeptid und C-Terminus	97
3.3	Expression und Kristallisation der K_v1.3 T1 Domäne	98
3.3.1	Das K _v 1.3 T1K REE Konstrukt	98
3.3.2	Kristallisation des K _v 1.3 T1K REE Konstrukts	98
3.3.3.	Vorläufige Ergebnisse zur Struktur der K _v 1.3 T1 Domäne	99

4	Diskussion	101
4.1	Untersuchung der K_v3.4 T1-Domäne	101
4.1.1	Eigenschaften der T1-Domänen Konstrukte und ihre Auswirkung auf die Qualität der NMR Spektren	101
4.2	Untersuchung der cytosolischen K_v1.4 Konstrukte und ihrer Wechselwirkungen	103
4.2.1	Zuschnitt der Konstrukte und ihre Lösungseigenschaften	103

4.2.2	Vorraussetzungen für die Durchführung der NMR-Experimente	105
4.2.3	Erstellung und Überprüfung der sequentiellen Zuordnung	106
4.2.4	Titrationsexperimente	107
4.2.4.1	Interaktion des T1K Konstrukts mit dem Inaktivierungspeptid	107
4.2.4.2	Interaktion des Inaktivierungspeptids mit dem T1K Konstrukt	108
4.2.4.3	Modell zur Interaktion von T1-Domäne und Inaktivierungspeptid	109
4.2.4.4	Wechselwirkungen des T1K Konstrukts mit dem C-Terminus Konstrukt C84	111
4.2.4.5	Interaktion der T1 Domäne mit dem Inaktivierungspeptid und C-Terminus	112
4.3	Perspektiven für die NMR-spektroskopische Untersuchung der K_v Kanalkonstrukte	114
4.3.1	Mögliche Perspektiven für das K _v 3.4 Konstrukt	113
4.3.2	Weitere Arbeiten mit den Konstrukten des K _v 1.4 Kanalproteins	115
4.3.2.1	Weiterführung und Optimierung der Titrationen und ihrer Auswertung	115
4.3.2.2	Bestimmung einer NMR-Lösungsstruktur	116
4.3.2.3	Verknüpfung der gewonnenen Daten mit den elektrophysiologischen Eigenschaften der K _v Kaliumkanalproteine	116
4.4	K_v1.3 Ergebnisse und Perspektiven	117
5.	Zusammenfassung	118
6.	Literaturverzeichnis	120
7.	Abkürzungsverzeichnis	126
8.	Anhang	128
	Dank	140

1 Einleitung

1.1 Ionenkanalproteine

Die Erforschung von Ionenkanalproteinen basierte Jahrzehnte lang vor allem auf der Messung ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften mit Hilfe sogenannter Patch-clamp Experimente (Hille 2001) (Neher & Sakman 1992). Diese ließen meist nur indirekte Rückschlüsse auf die Funktionsweise der Kanäle zu. Es konnten so vor allem die Spannungscharakteristiken der Kanalöffnung ermittelt werden, die molekularen Grundlagen der Kanalfunktionen blieben aber lange Zeit im Dunkeln. Erste Rückschlüsse ermöglichten hier Mutationsstudien an Kanalproteinen die heterolog in Oocyten von *Xenopus laevis* überexprimiert und gezielt vermessen werden konnten (Stühmer, Pongs 1989).

Seit Mitte der 90er Jahre gab es aufgrund der Erfolge in der Sequenzierung verschiedener Säugetiergenome und in der Proteinstrukturaufklärung rasche Fortschritte bei der Identifizierung und strukturellen Charakterisierung von Ionenkanälen.

Inzwischen ist eine Vielzahl von Kanaltypen bekannt, die wahrscheinlich auf ein Grundmotiv, den Kaliumkanal, zurückzuführen sind. Kaliumkanäle kommen in allen Lebewesen von Bakterien und Archaeen bis zum Menschen vor, andere Ionenkanäle, wie Na^+ , Ca^+ und Cl^- -Kanäle finden sich oft nur bei höheren Organismen, die über eine komplexe Osmoregulation bzw. ein Nervensystem verfügen.

Ionenkanäle besitzen vielfältige Funktionen in der Osmoregulation und Signaltransduktion vor allem im Muskelgewebe, neuronalen und sekretorischen Zellen. Die selektive Permeabilität der Zellmembran einer Zelle wird im wesentlichen durch die darin eingebetteten Ionenkanalproteine bestimmt. In Verbindung mit den ebenfalls ionenselektiven aktiven Transporterproteinen, wie z. B. der Na^+/K^+ ATPase (Lingrel & Kuntzweiler 1994), können so in bestimmten Kompartimenten definierte Ionenkonzentrationen erreicht und aufrechterhalten werden, da die hydrophobe Lipiddoppelschicht der Membran für Wasser und andere hydrophile Moleküle praktisch impermeabel ist. Damit werden die Voraussetzungen für zahlreiche lebenswichtige Prozesse in der Zelle geschaffen: Die entstehenden Membranpotentiale dienen als Energiequelle für die Funktion von molekularen Motoren und Transporterproteinen, der Ausbildung von Aktionspotentialen sowie der Steuerung der Sekretion von Neurotransmittern oder Hormonen.

Im komplexen Organismus von Vertebraten können z.B. durch eine Mutation oder fehlregulierte Expression eines Ionenkanalgens beträchtliche Störungen entstehen. Da viele Kanalproteine in den verschiedensten Geweben exprimiert werden, kommt es oft zu komplexen Krankheitsbildern.

Tab.1.1: Typische Ionenkonzentrationen im Cytosol und Interzellularraum von Säugerzellen (nach H. Lodish et al.: Molecular cell biology 4th ed. 2000)

Ion	Cytosol (mM)	Interzellularraum (mM)
K ⁺	139	4
Na ⁺	12	145
Cl ⁻	4	116
HCO ₃ ⁻	12	29
X ⁻ *	138	9
Mg ²⁺	0,8	1,5
Ca ²⁺	< 0,0002	1,8

(*) Proteine, die bei physiol. pH-Wert negativ geladen sind.

Mutationen bei Kaliumkanälen werden mit Herzrhythmusstörungen wie dem LQT Syndrom bestimmten Formen der Epilepsie, Lähmungserscheinungen der Skelettmuskulatur, Taubheit, aber auch Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes bei Neugeborenen in Verbindung gebracht (Ashcroft 2006). Da viele der Kanalproteine auch in weiten Teilen des Zentralen Nervensystems nachgewiesen werden konnten, sind auch Auswirkungen auf hochkomplexe Vorgänge wie Lernen und Erinnerungsvermögen denkbar, die jedoch im Maus-Knockoutmodell nur sehr eingeschränkt nachweisbar sind. Auch bei der Regulation der Expression spannungsgesteuerter Kaliumkanäle im ZNS und Epithelien zeichnen sich wichtige Funktionen ab. So wird bereits ein Zusammenhang zwischen der Regulation der Expressionslevel verschiedener spannungsgesteuerter Kaliumkanalproteine und den entzündlichen Prozessen bei Multipler Sklerose beschrieben (Beeton & Chandy 2005).

1.2 Die Hauptklassen der Kaliumkanäle

1.2.1 Allgemeiner Aufbau

Alle Ionenkanalproteine besitzen eine zentrale tetramere Anordnung zweier α-helikaler Transmembran-Elemente, die den eigentlichen Kanal für die Ionen bilden. Diese dienen gleichzeitig als stabilisierendes Element für das Selektivitätsfilter, welches durch den die Helices verbindenden Poren-Loop (P-Loop) gebildet wird. Dieser Loop enthält die für Kaliumkanäle charakteristische hochkonservierte Signatursequenz TVGYG (Thr-Val-Gly-Tyr-Gly). Mit Hilfe dieses Sequenzmotivs gelang es z. B. nach der Sequenzierung des humanen Genoms im Human Genome Project (HUGO) viele bis zu diesem Zeitpunkt unbekannte Kaliumkanalgene zu identifizieren.

Für die Beschreibung der Transmembrantopologie der Kanalproteine wird häufig (z.B. von der IUPHAR) eine Kurzschreibweise verwendet, die die Anzahl der Transmembranhelices

(TM) pro Protein-Monomer und die Anzahl der Poren (P) des funktionellen Kanals in der Formulierung nTM/mP angibt.

In Abbildung 1.1 sind die vier Hauptklassen der Kaliumkanäle dargestellt.

Einige einfache Kanalproteine bestehen nur aus der zentralen Porenanordnung, wie z.B. der bakterielle KcsA-Kanal. Der K_r -Kanal der Säuger besitzt bereits N- und C-terminale Domänen, die regulatorische Funktionen haben.

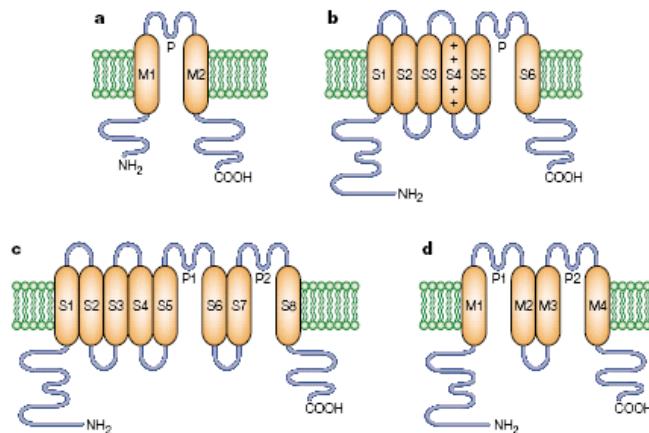


Abb. 1.1: Die vier Hauptklassen der Kaliumkanäle (nach Choe 2002 Nature Rev.Neurosci.). **(a)** Die Klasse der 2TM/1P Kanäle enthält die bakteriellen KcsA-Kanäle und die K_r Kanäle der Säuger. **(b)** Mitglieder der Klasse der 6TM/1P Kanäle sind neben den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen auch ligandengesteuerte Kanäle. Die (+) Zeichen symbolisieren die positiven Ladungen der S4 Helix als Spannungssensor. **(c)** Die 8TM/2P Kanäle sind Hybride aus 6TM/1P und 2TM/1P Kanälen und wurden zuerst bei Hefen entdeckt. **(d)** Die 4TM/2P Kanäle werden auch als ‚Leakage channels‘ bezeichnet und sind Angriffspunkt für viele Anästhetika.

Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, werden als K_v -Kanalfamilie bezeichnet und besitzen noch vier weitere α -helikale Transmembranelemente. Diese werden als S1 bis S4 bezeichnet, die eigentlichen Porenhelices als S5 und S6. Die S4 Helix besitzt an jeder 3. Sequenzposition eine Aminosäure, deren Rest eine positive Ladung trägt. Dieses auffällige Sequenzmotiv wurde als Spannungssensor identifiziert.

Während spannungsgesteuerte Kaliumkanäle aus vier unabhängigen, meist identischen Proteinen bestehen, die in der Membran zum Tetramer assoziiert vorliegen und so den funktionellen Ionenkanal bilden, bestehen Natrium- und Kalziumkanäle aus vier zu den Transmembrandomänen der Kaliumkanalproteine homologen Domänen, die jeweils über einen Spannungssensor verfügen und durch untereinander nicht homologe cytosolische Sequenzabschnitte verbunden sind. Diese variablen Sequenzabschnitte bilden die regulatorischen Domänen des jeweiligen Kanals. Man geht daher davon aus, dass es sich bei den Na^+ - und Ca^{2+} -Kanälen phylogenetisch um eine Weiterentwicklung des ursprünglichen Bauprinzips der K_v -Kanäle handelt. Dafür spricht auch, dass bei niedrigeren Organismen zunächst nur K^+ -Kanäle auftreten.

Auch bei den spannungsgesteuerten K^+ Kanälen übernehmen die weniger homologen N- und C-terminalen cytosolischen Domänen regulatorische Funktionen. Speziell die N-terminale Tetramerisierungsdomäne ist hier hoch konserviert und von zentraler Bedeutung (Yi, Minor & Jan 2001).

Weitere Vertreter der Kaliumkanäle sind die bis heute weniger erforschten 8TM/2P und 4TM/2P Kanäle. Diese Kanalproteine, die vermutlich als Dimere vorliegen und so mit 4P-Loops funktionelle Kanäle bilden können, besitzen keinen Spannungssensor.

Die 4TM/2P Kanäle, auch als ‚Leakage Channels‘ bezeichnet, wurden als die Bindungspartner (Targets) zahlreicher Anästhetika identifiziert (Goldstein 2001).

1.3 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle: Die Identifizierung der K_v -Kanäle

Der erste identifizierte Vertreter der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle war der Shaker-Kanal der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Aufgrund einer Mutation dieses Kanalproteins trat unter Ether-Anästhesie heftiges Zittern auf. Patch-clamp Messungen an Neuronen dieser Shaker-Mutante zeigten abnorm verlängerte Aktionspotentiale. Durch Klonierung des Shaker-Wildtyps und anschließende elektrophysiologische Untersuchungen des in *Xenopus*-Oocyten exprimierten 656AS langen Proteins konnte die K_v -Kanalfunktion nachgewiesen werden. (Salkoff & Wyman 1981). Die Mutation selbst führt zu einer Blockade des Kanals, verhindert damit die typische Reaktion des Kanals auf die Depolarisierung der Membran und führt so zu den beschriebenen motorischen Auffälligkeiten.

1.3.1 Der Klassische Ball und Chain Mechanismus nach Armstrong

Schon lange Zeit vor der Entschlüsselung der ersten Kaliumkanalstrukturen, wurde basierend auf elektrophysiologischen Untersuchungen, bei denen der Effekt verschiedener Kanalblocker-Substanzen wie TAE und langkettigerer Derivate quartärer Amine auf die Ionenleitfähigkeit der Kanäle bestimmt wurde, ein Modell für die verschiedenen Öffnungszustände der Kanäle erstellt (Armstrong & Bezanilla 1977). Demnach besitzt der Kanal neben den zwei erwarteten Zuständen ‚geöffnet‘ und ‚geschlossen‘ noch einen weiteren Zustand, der als inaktiviert bezeichnet wird. Dieser Zustand, unterscheidet sich vom geschlossenen auch als deaktiviert bezeichneten Zustand dadurch, dass der Kanal nicht mehr durch eine Depolarisation der Membran geöffnet (aktiviert) werden kann. Dieses Phänomen ist bei neuronalen Kanalproteinen auch als Refraktärzeit bekannt. Zur Entwicklung der Ball-Hypothese führte die Beobachtung, dass die Inaktivierung eines Kanals durch die Behandlung mit einer Protease verhindert werden konnte (Armstrong 1973) und

erst nach einer definierten Zeitspanne eintrat. Bei Na^+ Kanälen wurde später ein Verbindungsloop zwischen den 6TM Domänen als Ursache für die Inaktivierung identifiziert (Yellen 1998). Der Inaktivierungsmechanismus der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle jedoch entspricht fast genau diesem Modell.

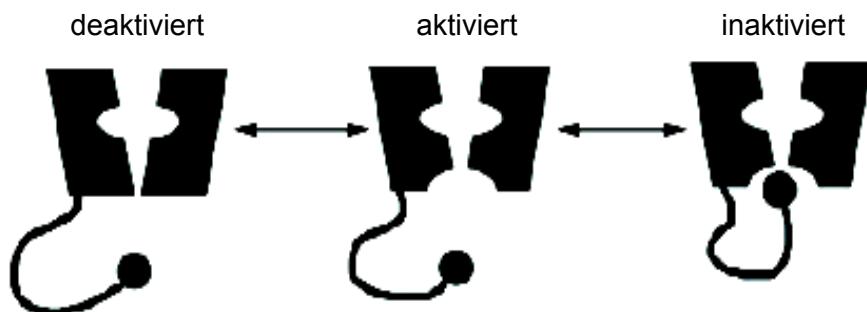


Abb 1.2: Allgemeines Schema zum Mechanismus der spannungsgesteuerten Ionenkanäle.

Da die Inaktivierung stets nach einer definierten Zeitspanne eintrat und dieser Effekt durch die Behandlung mit einer Protease aufgehoben werden konnte, wurde schon lange vor der Entschlüsselung der ersten Kaliumkanal-Strukturen dieses Modell entwickelt. (nach Armstrong 1977 verändert)

1.3.2 Typischer Aufbau der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle

Abbildung 1.3 zeigt eine schematische Darstellung der Domänen eines K_v -Kanals. Das zentrale Element ist die Transmembrandomäne mit den sechs transmembran- α -Helices. Auffällig ist hier vor allem die S4 Helix, die als Spannungssensor dient und in jeder dritten Sequenzposition eine Aminosäure mit positiv geladenem Rest trägt. Die eigentliche Pore wird von der S5 und der S6 Helix gebildet, die durch den Porenloop verbunden sind. Die S6 Helix nimmt durch das PXP Motiv, das sich etwa in der Mitte der Membran befindet, eine leicht eingeknickte (kinked) Position ein, die mit dem Kanalöffnungsmechanismus (Gating) in Verbindung gebracht wird. Der Porenloop enthält neben einer kurzen Porenhelix, die ebenfalls in die Membran eingebettet ist, auch die TVGYG-Signatursequenz der K^+ -Kanäle, die Teil des vom P-Loop gebildeten Selektivitätsfilters ist. Die Aminosäuresequenz im Bereich der Helices ist in hohem Maße konserviert, ebenso wie die des Selektivitätsfilters (Doyle 1998). Weit weniger stark konserviert sind die Sequenzen der übrigen Loops, die sich außerhalb der Membran befinden. Dies gilt auch für die N- und C-Termini des K_v -Proteins, die in das Cytosol hineinragen.

Eine Ausnahme bildet hier die T1- oder Tetramerisierungsdomäne, die N-terminal der S1 Helix vorgelagert ist. Sie bewirkt die stabile Tetramerisierung der Kanalproteine. Der N-Terminus selbst bildet bei schnell inaktivierenden Kanälen das Inaktivierungspeptid (IP), ein etwa 20 bis 30AS langes Sequenzmotiv, das häufig ungefaltet vorliegt. Der ebenfalls meist

ungefaltete C-Terminus endet mit einer Erkennungssequenz für die Bindung an PDZ-Domänen, dem ETDV Motiv, das innerhalb der Kv Kanalfamilien konserviert ist.

Es wird deutlich, dass Variationen in den nicht so hoch konservierten Domänen die unterschiedlichen Funktionen bzw. die gezielte Regulation der einzelnen Kv-Kanalproteine ermöglichen.

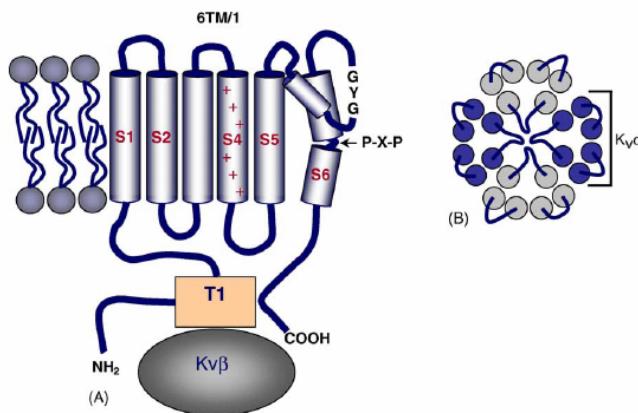


Abb. 1.3: Aufbau eines Kv-Kanals (O'Grady & Lee 2005) **(A)** Schematische Abbildung eines Monomers eines Kv-Kanals mit typischer 6TM/1P Konfiguration. Gemäß der Konvention ist der Extrazellulärraum oberhalb der Membran, das Cytosol unterhalb dargestellt. **(B)** Extrazelluläre Aufsicht der Anordnung der Transmembran-Helices. Die nähere Beschreibung erfolgt im Text.

Bei einigen Kanälen wurden noch weitere Funktionalitäten identifiziert, so trägt der N-Terminus des Kv1.4-Kanalproteins neben dem zuerst identifizierten IP noch einen weiteren Sequenzabschnitt, der an der Inaktivierung beteiligt ist (Wissmann, Fakler et al. 2003).

Wie fast alle Transmembranproteine unterliegen auch Kv Proteine posttranslationalen Modifikationen. Beschrieben werden u.a. Serin-Phosphorylierungen, N-Glycosylierungen am extracellulären S1-S2 Loop aber auch die Palmitoylierung an einem Cysteinrest im cytosolischen S2-S3 Loop (Gubitosi-Klug 2005).

Viele Kv-Kanäle liegen in vivo im Komplex mit einer sogenannten Kv β -Untereinheit vor, die in der Regel am N-Terminus über ein funktionelles Inaktivierungspeptid verfügen

Diese löslichen cytosolischen Proteine, die wie der Kanal selbst als Tetramer vorliegen liegen als selbständiges Gen im Genom vor und werden so unabhängig von den auch als Kv α Untereinheit bezeichneten eigentlichen Kanalproteinen exprimiert. Die Kv β Untereinheit gehört zur Superfamilie der Aldo-Ketoreduktasen und besitzt dementsprechend eine Bindungstelle für NADPH (Gulbis et al. 1999). Deren enzymatische Aktivität konnte zunächst nicht nachgewiesen werden, sie wird jedoch im Zusammenhang mit einer möglichen Funktion als Redox-Sensor diskutiert.

1.3.3 Die Unterfamilien der K_v-Familie und ihre Nomenklatur

Nach den zuerst bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckten Kaliumkanälen, die als *shaker*, *shab*, *shaw* und *shal* bezeichnet wurden, wurden auch die ab 1989 klonierten Säugerproteine zunächst mit dazu analogen Bezeichnungen versehen: z.B. *Raw* für ein zu *shaw* homologes Protein der Ratte (*Rattus rattus*). Wurden weitere Proteine der selben Unterfamilie entdeckt, so wurde zusätzlich nummeriert. Parallel wurden, wie in Tabelle 1.2 ersichtlich, auch eher unsystematische Bezeichnungen verwendet die oft nur einen Teil der Proteine einer Kanalfamilie umfassten oder in der Numerierung abwichen.

Tab. 1.2: Genbezeichnungen der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle nach der K_v und KCN Nomenklatur, aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Kanalfamilien dargestellt, zu den Unterfamilien siehe Tabelle 3. Bei der KCN Nomenklatur wurden nur Gene von kanalbildenden Proteinen berücksichtigt, die mit * gekennzeichneten KCNH Kanäle werden in der KCN Nomenklatur zu einer Familie zusammengefasst, obwohl nur eine relativ geringe Sequenzhomologie besteht. (Quelle: Gutman 2005 und IUPHAR 2002)

K _v Nomenklatur	KCN Nomenklatur	Anzahl Kanäle	Topologie des Proteins	Bezeichnung der Kanalproteine
K _v 1	KCNA	8	6TM/1P	Shaker-ähnliche K _v
K _v 2	KCNB	2	6TM/1P	Shab-ähnliche K _v
K _v 3	KCNC	4	6TM/1P	Shaw-ähnliche K _v
K _v 4	KCND	3	6TM/1P	Shal-ähnliche K _v
K _v 5	KCNF	1	6TM/1P	Modulator ohne Kanalfunktion
K _v 6	KCNG	4	6TM/1P	Modulator ohne Kanalfunktion
K _v 7	KCNQ	5	6TM/1P	K _v
K _v 8	KCNV	2	6TM/1P	Modulator ohne Kanalfunktion
K _v 9	KCNS	3	6TM/1P	Modulator ohne Kanalfunktion
K _v 10	KCNH*	2	6TM/1P	eag
K _v 11	KCNH*	3	6TM/1P	erg
K _v 12	KCNH*	3	6TM/1P	elk
nn	KCNJ	15	2TM/1P	K _{ir} Kanäle
nn	KCNK	9	4TM/2P	TWIK, TASK, TREK
nn	KCNMA	1	7TM/1P	maxi-K _{Ca}
nn	KCNN	4	6TM/1P	SK _{Ca} bzw. IK _{Ca}

Eine direkte Übernahme der Bezeichnungen der Insektengene war schon deshalb nicht möglich, da die Kanalproteine einer Kanalfamilie bei *Drosophila* durch selektives Spleißen der von einem einzigen Gen abgelesenen mRNA entstehen, bei Säugern jedoch als einzelne Gene in jeweils einer Kopie im Genom vorliegen. Daher wurde ab 1993 mit der K_v Nomenklatur von der International Union of Pharmacology (IUPHAR) eine systematische Bezeichnung der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle eingeführt. Diese beruht auf der phylogenetischen Verwandschaft der Kanalproteine (Gutman 1993). Eine Unterfamilie ist hier als Gruppe von 6TM Kaliumkanalproteinen definiert, die mindestens 65% Sequenzidentität aufweisen.

Parallel wurde von der Human Genome Organisation die KCN Nomenklatur entwickelt (White 1997), die jedoch auch strukturell und phylogenetisch nicht nah verwandte Effektoren und Kanäle wie z.B. K_{ir} einschließt. Auch werden hier Kanäle mit deutlich geringerer Sequenzidentität wie *eag*, *erg* und *elk* in einer Unterfamilie zusammengefasst.

Da auch in den folgenden Jahren weitere Kaliumkanäle identifiziert und charakterisiert wurden, musste die Nomenklatur laufend aktualisiert werden. Für die Tabellen 1.2 und 1.3 wurde die K_v Nomenklatur der IUPHAR von 2005 (Gutman 2005) und die KCN Nomenklatur der HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) (<http://www.gene.ucl.ac.uk>) verwendet.

Tab. 1.3: Die Unterfamilien der K_v1 und K_v3 Familien mit einigen der alten Gen- bzw Proteinbezeichnungen (sofern für diese Arbeit relevant) und ihre funktionellen Eigenschaften. Quelle: Gutman 2005

K_v Nomenklatur	KCN Nomenklatur	Andere Bezeichnungen	Funktionstyp
$K_v1.1$	KCNA1	RCK1, HuK (I), MK1	delayed rectifier
$K_v1.2$	KCNA2	RCK5, HuK (IV), MK2	delayed rectifier
$K_v1.3$	KCNA3	RCK3, HuK (III), MK3	delayed rectifier
$K_v1.4$	KCNA4	RCK4, HuK (II), MK4	A-Typ, schnellinaktivierend
$K_v1.5$	KCNA5	HuK (II)	delayed rectifier
$K_v1.6$	KCNA6	RCK2, MK1.6	delayed rectifier
$K_v1.7$	KCNA7	-	delayed rectifier
$K_v1.8$	KCNA10	$K_v1.10$	delayed rectifier
$K_v3.1$	KCNC1	Raw2, KShIIIB	delayed rectifier
$K_v3.2$	KCNC2	Raw1, RKShIIIA	delayed rectifier
$K_v3.3$	KCNC3	RKShIID	A-Typ
$K_v3.4$	KCNC4	Raw3, RKShIIIC	A-Typ, schnellinaktivierend

1.3.4 Allgemeine Kanalfunktion der K_v -Kanäle

Die am besten untersuchte Funktion der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle ist der K^+ -Ausstrom, der bei Neuronen im Verlauf eines Aktionspotentials auf die Depolarisierung der zuvor gegenüber dem Cytosol negativ geladenen Membran durch den Einstrom von Na^+ -Ionen folgt. Durch den Ausstrom von Kaliumionen erfolgt eine Repolarisierung der Membran, so dass eine rasche Folge von Aktionspotentialen und damit die Codierung neuronaler Signale ermöglicht wird. Durch die für einige der K_v -Kanäle ($K_v1.4$ und $K_v3.4$) charakteristische schnelle Inaktivierung der Kanäle wird eine gerichtete Ausbreitung des Aktionspotentials ermöglicht während die charakteristischen Ionenkonzentrationen durch die Funktion der Na^+/K^+ ATPase aufrechterhalten werden.

Nur wenige der K_v -Kanäle sind für sich allein genommen schnellinaktivierend da sie ein funktionelles Inaktivierungspeptid besitzen, viele weitere (vor allem Mitglieder der K_v Familie) liegen jedoch spezifisch im Komplex mit $K_v\beta$ Untereinheiten vor. Wie aufgrund ihrer Funktion zu vermuten, finden sich vor allem im Zentralen Nervensystem und in den peripheren Neuronen hohe Dichten von K_v -Kanalproteinen. Insbesondere in den dendritischen Bereichen, am Axon und Axonursprung sowie im Bereich der Synapsen wurden mit Immunofluoreszenz- und Immunohistochemischen Methoden hohe Dichten von K_v -Proteinen bestimmt. Im Bereich von Ranvier'schen Schnürringen ist die Kanaldichte ebenfalls extrem hoch. Dabei ist eine spezifische Verteilung der verschiedenen K_v -Kanäle zu beobachten, die vermutlich durch die Kanalfunktion bedingt ist. Auch bei entsprechenden Untersuchungen an Gehirnschnitten von Ratten wurden entsprechende Verteilungsmuster beobachtet, die sich auch mit dem Entwicklungsstadium der Tiere verändern (Beckh & Pongs 1990). Neben diesen zu erwartenden Funktionen werden K_v Kanäle auch in Epithelien exprimiert (O'Grady & Lee 2005). Hier wurde in Tumorgewebe der Brust, der Prostata und des Dickdarms mittels RT-PCR eine deutlich erhöhte Expression bestimmter K_v Kanalproteine der K_v1 bzw. K_v3 Familie festgestellt.

Auch eine Beteiligung der verschiedenen Kanäle an noch nicht genau identifizierten Mechanismen der Zellproliferation, Wundheilung (Lotz et al. 2004) und Apoptose sowie eine Funktion als Sensor für die O_2 -Konzentration in Verbindung mit der $K_v\beta$ -Untereinheit als Redox-Sensor (Lopez-Barneo et al. 2004) werden diskutiert. Neuerdings wird auch von einer Änderung des Expressionsmusters der verschiedenen K_v -Kanalfamilien in verschiedenen Stadien der Zellproliferation berichtet (Miguel-Velado, Lopez-Lopez 2005).

1.4 Strukturbestimmung bei K_v-Kanalproteinen

Vor der Lösung der ersten Kristallstruktur eines vollständigen K_v Kanalproteins durch MacKinnon und Mitarbeiter im Jahr 2005 wurden einfacher gebaute, meist bakterielle Kanäle als Modellstrukturen verwendet, um vor allem die Porenstruktur und Funktion zu untersuchen.

Die Expression und Aufbereitung von Membranproteinen gestaltet sich häufig problematisch, da ausreichend lösliche und stabile Konstrukte in ausreichender Menge für die Kristallisation meist nur schwer herzustellen sind. Grund für die Schwierigkeiten sind vor allem die hydrophoben Transmembranbereiche der Kanalproteine die den Einsatz von Detergenzien etc. erfordern (vgl. auch Abschnitt 1.7 Proteinfaltung). Bei der Kristallisation von Kaliumkanalproteinen waren meist ‚Hilfsproteine‘ wie Fab Fragmente oder die Anwesenheit einer K_vβ Untereinheit erforderlich um eine ausreichende Stabilität der Proteine zu erreichen. In der NMR ist ebenfalls eine ausreichend hoch konzentrierte und stabile Proteinlösung erforderlich. Dies konnte bislang nur bei einzelnen cytosolischen Domänen wie dem IP (Antz, Kalbitzer 1997) oder T1 Domänen (Kreusch, Choe 1998) erreicht werden. Für die NMR besteht durch die Gesamtgröße der tetrameren K_v-Proteine von über 200kD eine weitere Limitierung, die zu Überwinden zusätzlichen experimentellen Aufwand erfordert (siehe NMR, Kapitel 1.8).

Im folgenden werden die einzelnen Domänen des K_v Kanals dargestellt und ihre Funktionen anhand verschiedener Modellstrukturen und der 2005 von MacKinnon et al. gelösten Struktur des shaker-ähnlichen Kaliumkanals K_v1.2 diskutiert. Tabelle 1.4 enthält eine Zusammenstellung der wichtigsten Modellstrukturen und der an ihnen untersuchten Kanalfunktionen. Die K_v1.2 Struktur ist unter Punkt 1.4.5 ausführlicher dargestellt.

Tab. 1.4: Übersicht zu wichtigen (Modell-)Strukturen für die Untersuchung von K_v-Kanalproteinen

K ⁺ -Kanal	Auflösung	Topologie	Zustand	Modell für folgendes Strukturelement	Autoren, Jahr
KcsA <i>Streptomyces lividans</i>	beste Struktur. 1.9 Å	2TM/1P	geschlossen	Selektivitätsfilter	Doyle 1998 MacKinnon 2001 MacKinnon 2003
KvAP <i>Aeropyrum pernix</i>	3,2Å 1,9 Å (nur Spannungssensor)	6TM/1P	geöffnet	Spannungssensor Kanalöffnungsmechanismus	Jiang, MacKinnon et al. 2003
K_v1.2 Ratte	2,9Å	6TM/1P	geöffnet	Erste Struktur eines vollständigen K _v Kanalproteins	Long & MacKinnon 2005

1.4.1 Die Transmembran-Domäne

Die Transmembrandomäne der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle besteht neben der eigentlichen Pore mit dem Selektivitätsfilter und dem Kanalöffnungsmechanismus (gebildet aus der S5 und S6 Helix) aus vier weiteren Transmembran α -Helices, von denen die S4 Helix als eigentlicher Spannungssensor identifiziert wurde.

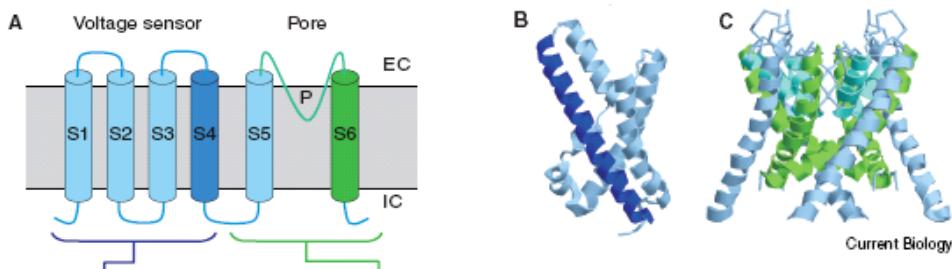


Abb. 1.4: (A) Die Transmembran-Topologie einer einzelnen K_v Untereinheit. Daneben sind Strukturmodelle einer einzelnen Spannungssensor-Domäne (B) und des Tetramers der Porenregion (C) dargestellt. Die extracelluläre Seite aller drei Modelle weist nach oben. Die Modelle wurden auf der Basis der Strukturdaten des bakteriellen 6TM/1P Kanals KvAP erstellt: (B) PDB 1ORQ (C) PDB 1ORS. (Sands, Sansom Curr. Biol. 2005 Fig. 1)

Abbildung 1.4 zeigt die eigentliche Porenregion in ihrer funktionellen, tetrameren Form, die Struktur der übrigen vier Helices mit dem Spannungssensor ist nur als Monomer dargestellt. Beide Strukturen sind Kristallstrukturen des bakteriellen KvAP Kanals (Jiang, MacKinnon et al. 2003). Abbildung 1.5 zeigt eine Aufsicht auf die in der Zellmembran gelegenen Komponenten des humanen $K_v1.2$ Kanals (MacKinnon 2005b). Auffällig ist, dass die S1 bis S4 Helix sich nicht, wie in Abbildung 1.3 (B) angedeutet, direkt an die Porenregion mit der S5 und S6 Helix angelagert sind und eine kompakte Struktur bilden, sondern als selbständige Domänen aus dem Komplex herausragen.

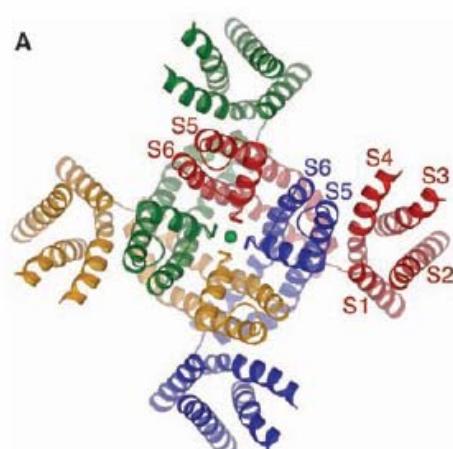


Abb. 1.5: Aufsicht auf die tetramere Transmembrandomäne des $Kv1.2$ Kanals gesehen von der extrazellulären Seite der Membran. (MacKinnon Science 2005b) Auffällig sind die vom eigentlichen Poren-Tetramer in die Membran hinausragenden Helices. Dabei befindet sich die S4 Spannungssensor-Helix in unmittelbarer Nähe zur S5 Helix der jeweils benachbarten Untereinheit.

1.4.2 Das Selektivitätsfilter: Signatursequenz und Schlüssel zur Kanalfunktion

Die Struktur des Selektivitätsfilters und damit die Basis für das Verständnis der ionenselektiven Funktion aller bekannten K^+ Kanäle konnte mit Hilfe der im Jahr 1998 von MacKinnon und Mitarbeitern (Doyle, MacKinnon et al. 1998) veröffentlichten Kristallstruktur des KcsA Kanals entschlüsselt werden. So wurde die zunächst in Mutationsstudien (Heginbotham, MacKinnon 1994) identifizierte Signatursequenz auch strukturell ihrer Funktion zugeordnet.

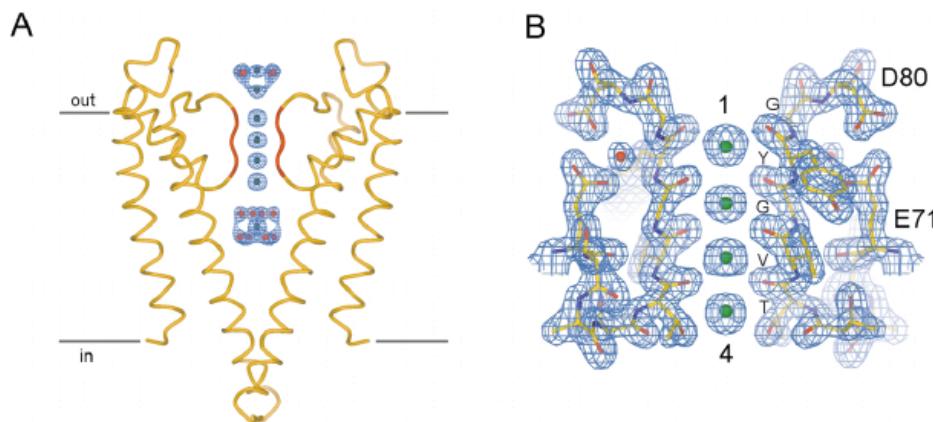


Abb. 1.6: KcsA-Struktur mit Selektivitätsfilter (Zhou & MacKinnon JMB 2003) **(A)** Struktur von zwei der vier Untereinheiten der Porenregion mit dem Selektivitätsfilter (rot dargestellt). Die Positionen von K^+ Ionen mit koordinierten Wassermolekülen in der zentralen Kavität (mitte) und im Interzellularraum (oben) sowie der „nackten“ Ionen im Selektivitätsfilter ist in der blauen Darstellung der Elektronendichte wiedergegeben. Die Abbildung stellt den geschlossenen Zustand des Kanals dar (siehe Gating). Die Überlagerung der S6 Helices auf der Intrazellulären Seite, die zur Bezeichnung „Inverted Teepee“ führte, ist der Kristallstruktur bei 200 mM K^+ mit einer Auflösung von 2,0 Å gut zu erkennen. **(B)** Elektronendichteverteilung im Bereich des Selektivitätsfilters, die konservierte TVGYG Sequenz ist entsprechend beschriftet. 1 und 4 bezeichnen die Positionen von K^+ Ionen im Selektivitätsfilter.

Wie an der KcsA-Struktur in Abbildung 1.6 (A) erkennbar befindet sich das Selektivitätsfilter im extrazellulären Drittelpart der Lipiddoppelschicht der Zellmembran, auf der intrazellularen Seite schließt sich eine als zentrale Kavität bezeichnete hydrophile Erweiterung an, die im geschlossenen Zustand vom Kanalöffnungsmechanismus begrenzt wird. Dieser wird von den sich überlappenden Endbereichen der S6 Helices gebildet. Diese Reusenförmige Struktur wird auch als „Inverted Teepee“ bezeichnet. (Doyle 1998) Ist der Kanal geöffnet, treten die S6 Helices auseinander und ermöglichen so den Durchtritt hydratisierter K^+ Ionen in die zentrale Kavität. An der Membran besteht durch die Depolarisierung während des Aktionspotentials ein elektrochemisches Potential, das den Austritt positiv geladener Ionen in den Interzellularraum begünstigt. Zusätzlich ist die K^+ Konzentration im Zellinneren etwa 30

fach höher als im Interzellularraum, während ausserhalb der Zellen Na^+ das vorherrschende Kation ist (vgl. Tabelle 1.1). Da das Selektivitätsfilter nur ein Drittel der Dicke der Membran einnimmt, besteht aufgrund der verkürzten Distanz der Kompartimente eine besonders hohe Potentialdifferenz die den Durchtritt der Ionen beschleunigt. Das eigentliche Selektivitätsfilter trägt die Signatursequenz der Kaliumkanäle, TVGYG. In der tetrameren Anordnung des funktionellen Kanals (Doyle et al. 1998) sind diese Sequenzabschnitte des Porenloops parallel so angeordnet, dass die K^+ Ionen ihre Hydrathülle abstreifen können und statt dessen an die Carbonyl-Sauerstoffatome des Proteinrückgrats und die Hydroxylgruppe des Threoninrests der hochkonservierten Aminosäuren der Signatursequenz koordinieren. Durch den definierten Abstand der koordinierenden Sauerstoffatome kann so eine hohe Selektivität für Kaliumionen erzielt werden, die mit einem Radius von 1,33 Å genau in die Koordinierungsposition passen. Na^+ Ionen sind zwar mit 0,95 Å Atomradius wesentlich kleiner, können aber gerade deshalb ihre Hydrathülle nicht vollständig abstreifen und das Selektivitätsfilter nicht passieren. Die Selektivität von K^+ gegenüber Na^+ beträgt so 1000:1.

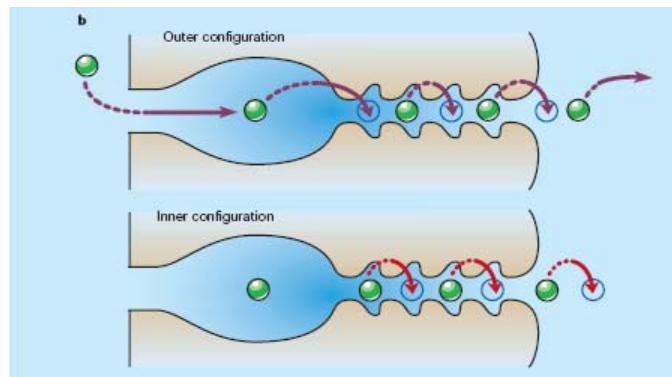


Abb. 1.7: Besetzungskonfigurationen des Selektivitätsfilters (Miller, Nature 2001) basierend auf Ergebnissen von Zhou, Morais-Cabral & MacKinnon 2001 und Berneche & Roux 2001. Insgesamt sind sechs Positionen für K^+ Ionen in der Pore beschrieben. Beginnend mit dem noch Hydratisierten K^+ Ion in der Kavität (Position 0) gelangen die Ionen über die Positionen 1 bis 4 des Selektivitätsfilters zur extrazellulären und wieder hydratisierten Position 5. Da immer nur jede zweite Koordinationsstelle besetzt werden kann, liegen zwei mögliche Konfigurationen vor: In der Äußenen Konfiguration sind Position 2 und 4 in der Inneren Konfiguration Position 1 und 3 besetzt.

Von den vier möglichen Koordinierungsstellen für K^+ Ionen im Selektivitätsfilter sind immer nur zwei besetzt, die Ionen bewegen sich aufgrund der elektrostatischen Abstoßung nach dem Eimerkettenprinzip durch das Selektivitätsfilter, wobei sich zwei verschiedene Besetzungskonformationen ergeben (siehe Abbildung 1.7).

Da weder Konformationsänderungen der Pore noch stabile Bindungen der Ionen an das Protein erfolgen ist der Energieaufwand für die Passage der Ionen so gering, dass Leitungsgeschwindigkeit mit etwa 10^8 K^+ Ionen pro Sekunde an das Diffusionslimit heranreicht.

Das Selektivitätsfilter ist jedoch nur in Gegenwart einer ausreichend hohen K^+ Konzentration funktionell. Kristallstrukturen die bei niedrigen K^+ Konzentrationen aufgenommen wurden (Zhou, MacKinnon Nature 2001) zeigen eine Deformation der Koordinationsstellen, die eine normale Funktion des Kanals verhindern. Dieser Mechanismus wird auch als C-Typ Inaktivierung bezeichnet (siehe auch Inaktivierungsmechanismen, 1.5.4).

1.4.3 Der Kanalöffnungsmechanismus

Der Kanalöffnungsmechanismus (Gating) ist wie das Selektivitätsfilter bei allen Kaliumkanälen hoch konserviert. Er besteht im wesentlichen aus einem Glycinrest in der S6 Helix, der der Helix so eine gewisse Flexibilität verleiht und ein Auseinandergleiten des S6 Helixbündels ermöglicht (Sands, Sansom 2005, Cuello, Perozo et al. 2004). K_v Kanäle besitzen carboxy-terminal zum konservierten Glycin in dieser Region der S6 Helix zusätzlich ein konserviertes PVP Sequenzmotiv, das ebenfalls als Angelpunkt für eine solche Bewegung dienen könnte und bei Mutationen zu Störungen des Kanalöffnungsmechanismus führt (Labro, Snyders et al. 2003).

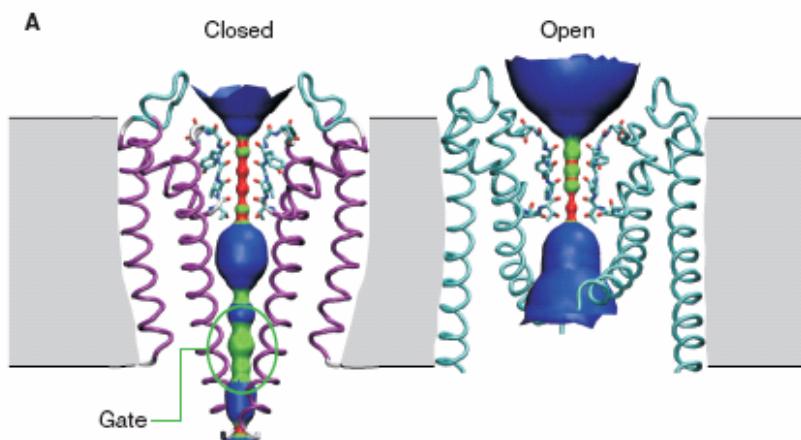


Abb. 1.8: (Sands, Sansom Curr Biol 2005) Modelle der Shaker K_v Porendomäne. Der geschlossene Kanal wurde auf die KcsA Kristallstruktur modelliert, der geöffnete Kanal auf die KvAP Struktur. Es sind jeweils nur zwei Untereinheiten dargestellt um die Übersichtlichkeit der Darstellung zu erhalten, der verengte Bereich der Pore (Gate) ist grün markiert. Neben den S5 und S6 Helices selbst ist die innere Oberfläche der Pore dargestellt, die sich durch die Öffnung des Kanals deutlich vergrößert. Neben der Bewegung der (inneren) S6 Helix ist auch eine Konformationsänderung im Bereich des Selektivitätsfilters (Ball and Stick Darstellung) und des äusseren Poreneingangs erkennbar.

Durch das Auseinanderweichen der in diesem Bereich hydrophoben Helices und weitere Konformationsänderungen wird für die intracellulär in hoher Konzentration vorhandenen K^+ Ionen der Weg in die Kavität der Pore freigegeben (siehe Abbildung 1.8).

Dieser Mechanismus wird, je nach Kanalfamilie durch äußere Parameter wie den pH Wert (KcsA), spezifische Liganden oder bei den spannungsgesteuerten K_v Kanälen durch das

elektrochemische Potential an der Zellmembran gesteuert. Hierzu sind Liganden bindende Domänen, bzw. ein Spannungssensor erforderlich.

1.4.4 Der Spannungssensor und seine Funktion

Im Gegensatz zu Liganden bindenden Domänen ist der Spannungssensor der Kv-Kanäle Teil der Transmembrandomäne der Proteine. Schon früh in der Geschichte der Erforschung von Ionenkanälen konnte unter geeigneten Bedingungen im Patch-Clamp Experiment die Verschiebung positiver Ladungen in der Membranebene nachgewiesen werden. Dies korrelierte mit der auffälligen Häufung positiver Ladungen innerhalb der S4 Helix der Transmembrandomäne und führte zur Entwicklung eines ersten Modells der Funktion des Spannungssensors bei dem eine Verschiebung der S4 Helix senkrecht zur Membranebene als Folge einer Depolarisierung der Membran angenommen wurde. Dieses Modell wird auch als Kanonisches- oder Sliding Helix Modell bezeichnet (Sands, Sansom 2005) . Basierend auf den in den Jahren 1998 bis 2005 gelösten Modellstrukturen entstanden verschiedene detailliertere Modelle für die Funktion des Spannungssensors und die Übermittlung der durch die Bewegung des Spannungssensors entstehenden Konformationsänderungen an den Kanalöffnungsmechanismus.

Das Paddle Modell (Jiang et al. 2003) postuliert, basierend auf der durch Fab-Fragmente stabilisierten KvAP-Struktur, die einem geöffneten Kanal entspricht, eine paddelartig in die Membranebene hinausragende Anordnung der S4 Helix die sich dann entsprechend dem aktuellen Membranpotential der Membranoberfläche annähert. Dieses Modell wird vor allem aufgrund des angenommenen direkten Kontakts der positiv geladenen Argininreste mit der hydrophoben Lipiddoppelschicht der Membran kritisiert (Sands, Sansom 2005). Im von Cuello (Cuello et al. 2004) vorgeschlagenen Topologiemodell sind die Helices entsprechend der Struktur der KvAP Spannungssensordomäne (vgl. Abbildung 1.1 B) angeordnet, alle Helices durchspannen hier die Membran und die Argininreste des Spannungssensors sind von diesen Helices gegen die hydrophoben Membranlipide abgeschirmt. Dieses Modell steht im wesentlichen in Einklang mit der Kristallstruktur des Kv1.2-Kanals. Diese erste Kristallstruktur eines vollständigen Kv-Kanalproteins gibt auch Hinweise auf die Übertragung der Bewegung der S4 Helix an die S6 Helix und damit den Kanalöffnungsmechanismus. Der S4-S5 Linker befindet sich in unmittelbarer Nähe zum cytosolischen Ende der S6 Helix der selben Untereinheit und wäre somit in der Lage, eine Konformationsänderung an den beweglichen Teil der S6 Helix zu übertragen (Long, MacKinnon 2005b).

1.4.5 K_v1.2: Ein shaker-ähnlicher Kaliumkanal des Menschen

Die 2005 von Roderick MacKinnon und Mitarbeitern gelöste Kristallstruktur (Long, MacKinnon et al. 2005) des spannungsgesteuerten Kaliumkanals K_v1.2 erlaubt erstmals den Blick auf einen vollständigen, tetrameren K_v Porenkomplex der auch die ebenfalls tetramere K_v β_2 Untereinheit trägt, diese ist jedoch N-terminal verkürzt und besitzt daher kein Inaktivierungspeptid. Die mit 2,9 Å relativ geringe Auflösung führt dazu, dass der T1-S1 Linker nur unvollständig abgebildet wird, gleiches gilt für Teile des Spannungssensors. Das verwendete Proteinkonstrukt enthält keinen C-Terminus, es endet direkt mit der S6 Helix.

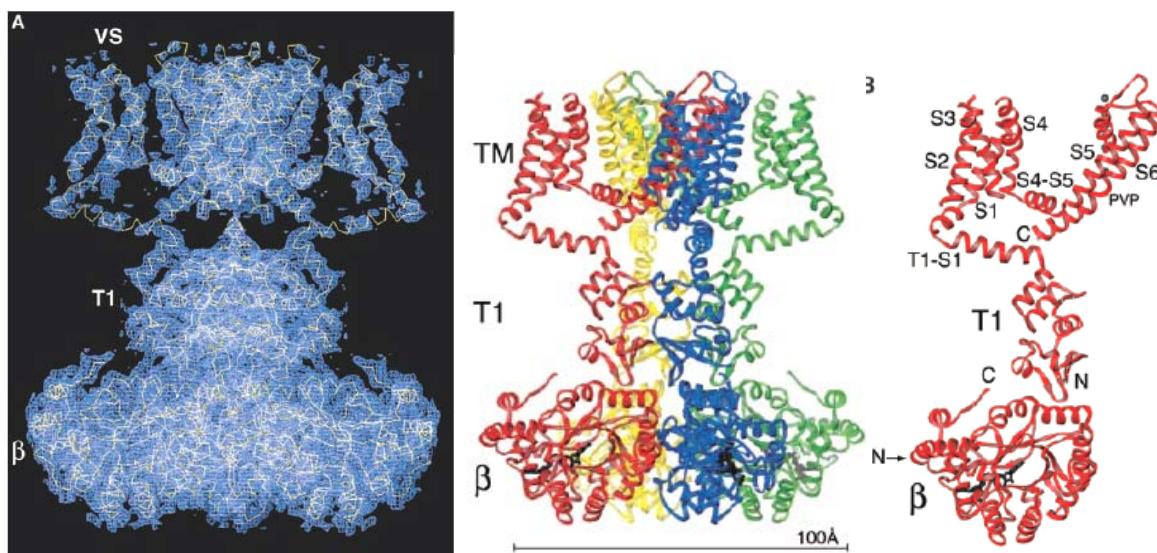


Abb. 1.9: Elektronendichtekarte (links) und Band-Darstellung (mitte) der Kristallstruktur von K_v1.2 (Long, MacKinnon et al. Science 2005), rechts ist ein Monomer des K_v β_4 Komplexes dargestellt. Die Auflösung beträgt 2,9 Å .Die Kristallisierungsbedingungen sind 30-40% PEG400 100-200 mM KCl oder NaCl, 100 mM Tris-HCL pH 8,5, 20 mM DTT, 20 mM TCEP und 1m M EDTA bei 20°C.

1.5 Die Intrazellulären Domänen und ihre Funktionen

Wesentliche regulatorische Funktionen werden bei den K_v-Kanalproteinen von den intrazellulären Domänen übernommen. Diese sind neben der Steuerung der Tetramerisierung durch die T1 Domäne auch mit der carboxyterminalen Domäne an der Verankerung der Kanäle an Gerüstproteinen beteiligt. Die intrazellulären Domänen bzw. die sie verbindenden Linkersequenzen tragen ebenfalls die Erkennungssequenzen für den geordneten Transport der Kanäle an die Zelloberfläche (Misonou & Trimmer 2004). Das N-terminale Inaktivierungspeptid ist die wesentliche Komponente zur Erzeugung der schnellinaktivierenden A-Typ Spannungscharakteristik.

1.5.1 Die Tetramerisierungs Domäne (T1)

Die T1 Domäne nimmt im Bezug auf die Funktionalität der K_v Kanäle und die Regulation der Kanalfunktion eine Schlüsselrolle ein. Neben der namensgebenden Funktion als Tetramerisierungsdomäne, die nicht nur die komplexe symmetrische Anordnung des Selektivitätsfilters und der gesamten Porenanordnung stabilisiert, sondern auch die Bildung von heterotetrameren K_v Kanalkomplexen innerhalb der jeweiligen Unterfamilie der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle ermöglicht, trägt sie auch das Inaktivierungspeptid und die Bindungsstelle für die $K_v\beta$ -Untereinheiten, die ebenfalls über ein Inaktivierungspeptid verfügen können. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die T1 Domäne für den korrekten Transport des $K_v1.2$ -Proteins zur Oberfläche des Axons notwendig ist (Gu & Jan 2003). Für $K_v1.3$ konnte gezeigt werden, dass einzelne Sekundärstrukturelemente sich schon beim Austritt des naszierenden Polypeptids aus dem Ribosom entwickeln. Unmittelbar nach der Synthese des T1-S1 Linkers erfolgt die Ausbildung der Tertiärstruktur der T1 Domäne und die damit gekoppelte Tetramerisierung des Proteins (Kosolapov & Deutsch 2004).

Als erste Kristallstruktur einer T1 Domäne wurde 1998 die Struktur der $AK_v1.1$ T1 Domäne von *Aplysia californica*, einer Seeschnecke, veröffentlicht (Kreusch, Choe 1998). In Abbildung 1.10 ist diese Struktur dargestellt, auffällig ist die dreischichtige Gliederung der Sekundärstrukturelemente beginnend mit der N-terminalen β -Faltblatt-Schicht (grün), die von zwei Paaren antiparalleler β -Stränge gebildet wird, welche von zwei kurzen α -helikalen Bereichen unterbrochen werden, so dass ein viersträngiges β -Faltblatt entsteht. Die mittlere Ebene (blau) besteht aus einer einzelnen 12 AS langen α -Helix, die in der carboxyterminalen dritten Ebene von einem weiteren β -Strang und einer α -Helix gefolgt wird.

Diese carboxyterminale Ebene weist zur Membran, das aminoterminale β -Faltblatt, das zum Cytosol ausgerichtet ist, dient als Bindestelle für die $K_v\beta$ Untereinheiten (Gulbis & MacKinnon 2000).

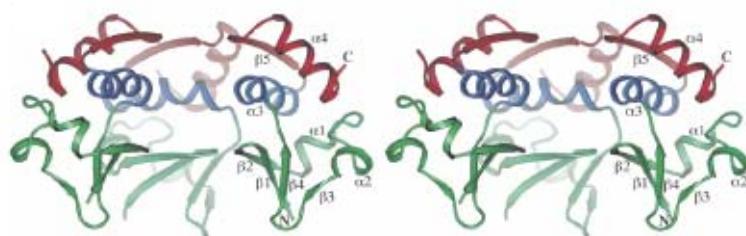


Abb. 1.10: Kristallstruktur der T1 Domäne des Shaker Typ Kv Kanals $AK_v1.1$, die Beschreibung erfolgt im Text (Kreusch, Choe, Nature 1998)

Die Oberfläche der AK_v1.1-Struktur zeigt eine ungleichmäßige Verteilung der elektrostatischen Ladungen (vgl. Abbildung 1.11). Die C-terminale potentielle Kontaktfläche zur TM-Region ist eher unpolär, die aminotermrale Oberfläche jedoch deutlich polär, wie auch die anderen zum Cytosol weisenden Flächen und der zentrale Kanal, der sich direkt in der Achse des Tetramers befindet. Dieser Kanal wurde zunächst als möglicher Eintrittsweg der Ionen in die zentrale Pore diskutiert, spätere Untersuchungen (Minor, Berger 2000) zeigten jedoch, dass der zuvor postulierte Durchtritt von hydratisierten K⁺-Ionen durch diesen Kanal sowohl aufgrund der positiven, und damit das Kation elektrostatisch abstoßenden Oberflächenladung im Zentrum des Tetramers als auch wegen des zu geringen Innendurchmessers nicht möglich ist.

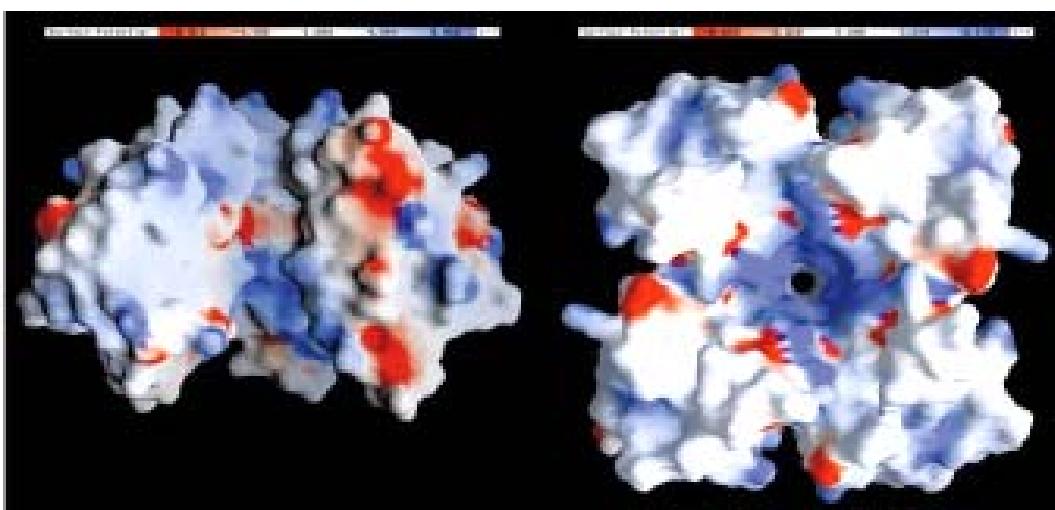


Abb. 1.11: Oberflächendarstellung der AK_v1.1 Struktur (Tetramer). Links eine Seitenansicht bei der eine Untereinheit weggelassen wurde, um einen Blick auf die Interaktionsflächen der K_v-Untereinheiten zu ermöglichen, rechts die carboxyterminale Aufsicht auf das vollständige Tetramer. Das elektrostatische Potential ist farbig dargestellt von blau (+10 kT) nach rot (-7 kT) (Kreusch, Choe Nature 1998)

Auch die Interaktionsfläche zwischen den einzelnen T1 Monomeren ist deutlich hydrophil. Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei sehr stabilen Protein-Protein Interaktionen, die in der Regel über unpolare Interaktionsflächen funktionieren, wird das T1 Tetramer durch hydrophile Wechselwirkungen stabilisiert, was bei weniger dauerhaften, z.B. regulatorischen Interaktionen häufiger der Fall ist. Der selbst für homologe Proteine auffällig hohe Grad der Konservierung bestimmter Residuen im Bereich der eher hydrophilen Interaktionsflächen der Untereinheiten wurde schon von Kreusch et al. (Kreusch, Choe 1998) festgestellt.

In systematischen Mutationsstudien mit der T1 Domäne von K_v1.2, in denen alle an den Interaktionen der T1-Untereinheiten beteiligten Aminosäuren sukzessive durch Alanine ausgetauscht wurden, konnten Minor et al. zeigen, dass auch geringfügige Veränderungen der Interaktionsflächen wie die Entfernung einer Wasserstoffbrücke oder eine isosterische

Mutation zu einer deutlichen Veränderung der Spannungscharakteristik des Kanals oder zu nicht funktionellen Kanälen führten. Dabei bewirkten auch Mutationen, die an der Oberfläche des Tetramers keine strukturellen Veränderungen hervorriefen teilweise deutliche Veränderungen. Eine T46V Mutation führte im Gegensatz zu den meisten anderen Mutationen zu einer Stabilisierung des Tetramers, was darauf hinweist, dass die Interaktion der T1 Domänen trotz der beobachteten Stabilität des T1 Tetramers nicht auf maximale Stabilität, sondern offenbar auf eine regulatorische Funktion hin ausgelegt sind (Minor, Berger 2000). Weiterhin konzentrieren sich die Aminosäurereste, die die Spannungscharakteristik beeinflussen, in sogenannten ‚hot spots‘ in enger räumlicher Nachbarschaft. Ein solches Verhalten wurde auch schon in früheren Mutationsstudien beobachtet (Cushman 2000). Auffällig ist auch die Häufung solcher Reste an der C-terminalen Oberfläche des Tetramers, was auf eine Interaktion mit den Loops der Transmembrandomäne des Kanals hinweisen könnte (Minor, Berger 2000). In diesem Zusammenhang wird auch eine Konformationsänderung der T1-Domäne in Verbindung mit der Regulation der Kanalöffnung diskutiert.

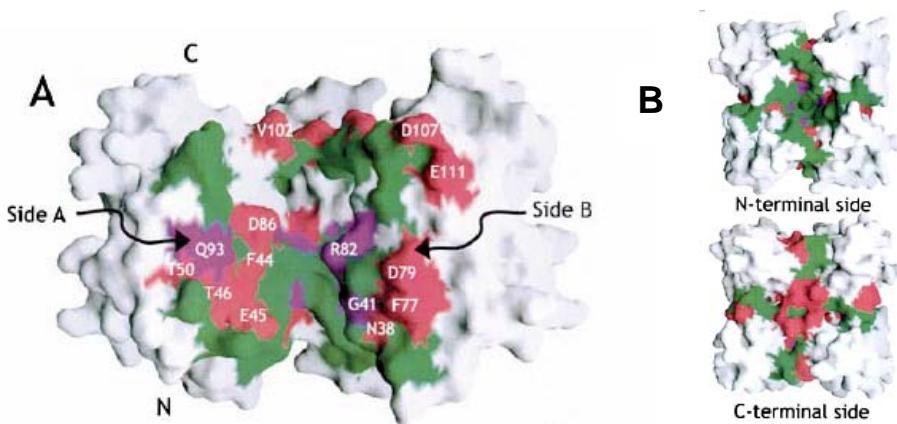


Abb. 1.12: Mutationsstudie von Minor et al. (Minor, Berger Cell 2000). **(A)** Oberflächendarstellung des Kv1.2 T1 Tetramers, eine Untereinheit wurde weggelassen um die Interaktionsflächen sichtbar zu machen. Die untersuchten Aminosäurerreste der Interaktionsflächen, sind farbig dargestellt: In rot dargestellt sind Reste, die beim Austausch durch Alanin zu einer deutlichen Änderung der Spannungscharakteristik des Kanals führen, grün dargestellte Reste zeigten keine Veränderung. Violett eingefärbte Reste führen bei Mutation dazu, dass kein funktionelles Kanalprotein mehr ausgebildet wurde. **(B)** N- und C-terminale Aufsicht auf das Tetramer mit gleicher Farbcodierung, auffällig ist die Häufung von sensiblen Resten an der C-terminalen Oberfläche, hier werden sogenannte ‚hot spots‘ ausgebildet.

Die Deletion der T1 Domäne kann die Bildung des Tetramers verhindern, unter Bedingungen der heterologen Überexpression bilden sich jedoch Tetramere (Kobertz, Miller 1999), die eine verlangsamte Kanalöffnung und eine veränderte Spannungscharakteristik aufweisen. Zwar kann die T1 Domäne in chimären Proteinen durch eine artifizielle Tetramerisierungsdomäne ersetzt werden, so dass ein funktioneller Kanal entsteht

(Zerangue, Jan&Jan 2000), dieser Kanal besitzt jedoch ebenfalls eine deutlich veränderte Spannungscharakteristik. Die Tetramerisierungsfunktion konnte zwar ersetzt werden, die Feinabstimmung des Kanalöffnungsmechanismus bleibt jedoch gestört. Dies ist zusammen mit den Ergebnissen von Minor et al. ein deutlicher Hinweis auf eine regulatorische Funktion der T1-Domäne im Kontext des spannungsgesteuerten Kanalöffnungsmechanismus.

Die hohe Konservierung der T1 Domäne innerhalb der K_v Familie ermöglicht die Ausbildung von heterotetrameren Kanälen. Dies ist vor allem im Bezug auf die damit erneut variierende Kanalöffnungs- und Spannungscharakteristik eine weitere Möglichkeit der Regulation. Meist werden die Heterotetramere innerhalb einer Unterfamilie ausgebildet. Es sind aber auch (vor allem bei *nicht-Shaker* Kanälen) Heterotetramere aus verschiedenen Unterfamilien bekannt, vor allem in Verbindung mit den Unterfamilien die als sogenannte regulatorische Proteine keine nachweisbare eigene Kanalfunktion besitzen. Vor allem in Hinblick darauf, dass ein einziges Inaktivierungspeptid ausreicht, um die Spannungscharakteristik eines Kanal von einem delayed rectifier Kanal zum schnellinaktivierenden zu verändern, ergibt sich hier eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Variation der Kanalfunktion.

Tab. 1.5: Bekannte Strukturen von T1 Domänen. Auffällig ist der oft unphysiologisch hohe pH Wert der Kristalle, pH-Änderungen werden von Jahng et al. (Jahng, Choe 2002) mit einer Konformationsänderung in Verbindung gebracht.

T1 Konstrukt	PDB Nr.	Kristalisationsbedingungen	pH Wert	Autor
AK_v1.1 (<i>Shaker</i>) (<i>Aplysia californica</i>)	1A68	Tris	8,5	Kreusch, Choe et al. 1998
AK_v3.1 (<i>Shaw</i>)	3KVT	unbekannt	8,5	Choe et al. 1998
K_v1.2 33-131 (<i>R.norvegicus</i>)	1QDV	MES	6,5	Minor et al. 1999
K_v1.2 33-119	1QDW	MES +GdmHCl	6,5	Minor et al. 1999
K_v1.2 33-119 T46V	1DSX	Tris	8,5	Minor et al. 2000
AK_v1.1 N136D	1EOD	HEPES	7,5	Pfaffinger et al. 2000
K_v1.1 (<i>Rattus norvegicus</i>) Komplex mit K_vβ_2	1EXB	Tris	8,6	MacKinnon et al. 2000
K_v4.2 (<i>Shal</i>) (<i>R.norvegicus</i>)	1NN7	Tris	8,5	Choe et al. 2003
K_v4.3 (human)	1S1G	Na/K P _i	10,6	Rhodes et al. 2004
K_v1.2 rat	2A79	Tris	8,5	MacKinnon et al. 2005

Eine Besonderheit der Kv1 (*shaker-ähnliche*) Unterfamilie ist, dass sie nicht über ein Zn²⁺ Bindemotiv verfügt. Dieses HX₅CX₂₀CC Sequenzmotiv innerhalb der T1 Domäne ermöglicht bei den Kv2, Kv3 und Kv4 Unterfamilien eine Stabilisierung des Tetramers durch die Koordination je eines Zn²⁺ Ions an den vier Interaktionsflächen der Untereinheiten (Jahng, Choe 2002; Bixby, Choe 1999).

Die Wechselwirkungen der T1 Domäne mit dem Inaktivierungspeptid und dem C-Terminus, die von verschiedenen Autoren diskutiert werden, werden im Folgenden zusammen mit der Beschreibung der jeweiligen Domäne vorgestellt.

1.5.2 Das Inaktivierungspeptid und seine Funktion:

Am N-Terminus befindet sich bei schnellinaktivierenden Kv-Kanälen das Inaktivierungspeptid, welches in Anlehnung an das ‚Ball and Chain‘ Modell auch als Ballpeptid bezeichnet wird. Hierbei handelt es sich um einen etwa 20-30 AS langen Abschnitt des Proteins, der oft positive Ladungen trägt. Werden bestimmte Teile dieses Bereichs oder der gesamte Sequenzabschnitt deletiert, so geht die schnellinaktivierende Spannungscharakteristik des Kanalproteins verloren. Das Inaktivierungspeptid ist durch eine flexible Linkersequenz, deren Länge je nach Kanalprotein zwischen einigen wenigen Aminosäuren (Kv3.4) und über 100 AS (Kv1.4) betragen kann, mit der T1 Domäne verbunden.

Nur wenige Kanalproteine wie Kv1.4 und Kv3.4 tragen ein eigenes funktionelles Ballpeptid, dennoch finden sich *in vivo* sehr viele schnellinaktivierende Kaliumkanäle. Dies ist zum einen auf die Bildung von Heterotetrameren zurückzuführen, darüber hinaus tragen einige Kvβ-Untereinheiten, die an die T1 Domänen binden, funktionelle Inaktivierungspeptide (Wissmann, Fakler 1999) mit ausreichend langem Linker. Die N-Terminalen nicht schnellinaktivierender Kanäle sind ebenfalls flexible ungefaltete Peptide mit deutlich unterschiedlicher Länge und wenig homologer Sequenz.

Auch die Inaktivierungspeptide selbst besitzen nicht in allen Fällen eine definierte Struktur. Eine stabile Faltung zu einem globulären Peptid mit hydrophobem Kern konnte bisher nur für das Kv3.4 IP nachgewiesen werden (Antz, Kalbitzer 1997), welches zusätzlich durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird. Die meisten Peptide weisen lediglich einen oder zwei helikale Abschnitte auf, die wesentlich weniger stabil sind (Wissmann, Fakler 2003). Solche helikalen Elemente konnten auch bei einer β-Untereinheit eines BK Kanals (KCNMB2) nachgewiesen werden (Bentrop, Fakler 2001).

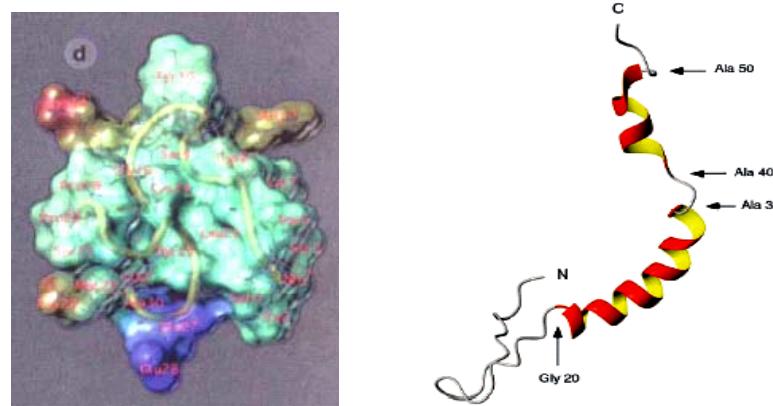


Abb. 1.13: Bekannte Strukturen der Inaktivierungspeptide von Kv3.4 (links) und Kv1.4 (rechts). Bei Kv3.4 (Antz, Kalbitzer 1997) ist die Oberflächenladung dargestellt, rot zeigt positive, blau negative Ladungen an. Kv1.4 (Wissmann, Fakler 2003) weist zwei helikale Bereiche auf, von denen der erste (AS 20-38) zusammen mit dem unstrukturierten N-Terminus das eigentliche IP bildet. Die zweite, kürzere Helix (AS 40-50) besteht aus kleinen hydrophoben Aminosäuren und dient möglicherweise zur Positionierung des eigentlichen IP.

Die meist wenig stabile Struktur der Inaktivierungspeptide steht vermutlich im Zusammenhang dem mit dem Mechanismus der Interaktion des IP mit der Kanalpore. Aufgrund der räumlichen Verhältnisse und der Ladungsverteilung im Bereich zwischen der T1 Domäne und dem Poreneingang wird angenommen, dass das Ballpeptid nicht im gefalteten Zustand in die Pore gelangen kann (Zhou, MacKinnon um 2001, MacKinnon 2005). Die Bindung von zumindest Teilen des Ballpeptids steht in Konkurrenz zur Bindung des Kanalblockers TEA und ist auch an Kanälen ohne T1-Domäne nachweisbar. Auch eine Wechselwirkung des IP bzw. seines Linkers mit der T1-Domäne konnte gezeigt werden (Baker, Wüthrich & Choe 2006).

1.5.3 C-Terminus : PDZ Bindedomäne und weitere mögliche Funktionen

Im Gegensatz zum N-Terminus ist das carboxyterminale Ende der Kv-Kanäle kaum erforscht. Das einzige Sequenzmotiv, dessen Funktion definitiv geklärt ist, ist das PDZ-Bindemotiv am äußersten C-Terminus des Kanals (Kim, Sheng 1995). Dabei bindet das bei Kv1-Kanälen hochkonservierte Sequenzmotiv ETDV an die zweite PDZ-Domäne von PSD-95, welches eines der wichtigsten Proteine innerhalb der Post Synaptic Density ist. So kann die Lokalisierung der Kanäle in den verschiedenen Bereichen der Zellmembran der Neuronen gezielt beeinflusst werden (Imamura, Fujiyoshi 2002).

Aufgrund der räumlichen Nähe zur T1 Domäne und der meist vorhandenen Kv β -Untereinheit werden auch Wechselwirkungen mit diesen Domänen vermutet. So konnten Sokolova et al. in elektronenmikroskopischen Studien die räumliche Nähe des C-Terminus zur T1-Domäne

zeigen (Abbildung 1.14; Sokolova, Grigorieff 2003). Allerdings ist die geringe Auflösung hier limitierend für die exakte Bewertung der Ergebnisse.

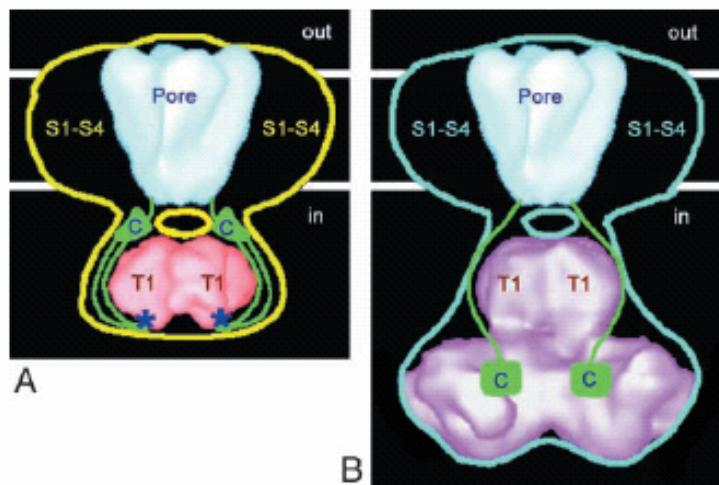


Abb. 1.14: Cartoon-Darstellung der möglichen Konformation des C-Terminus ohne (**A**) und mit (**B**) Anwesenheit einer Kv_β Untereinheit basierend auf elektronenmikroskopischen Daten (Sokolova, Grigorieff 2003). Der C-Terminus liegt nicht frei im Cytosol vor sondern ist an die T1-Domäne bzw. die Kv_β Untereinheit angelagert.

Des weiteren konnte von Mathew et al. gezeigt werden, dass bei dem schnellinaktivierenden Kv1.4-Kanal ein Austausch der C-terminalen Domäne durch den C-Terminus von nicht schnellinaktivierenden Kv1-Kanälen die Inaktivierungsrate und die Aufhebung der Inaktivierung beeinflusst wird. Werden lediglich bestimmte Sequenzabschnitte deletiert, so wird die Inaktivierungskinetik deutlich verlangsamt, ohne jedoch Spannungsabhängigkeit oder Ionenselektivität zu beeinflussen (Sankaranarayanan, Mathew 2005).

1.5.4 Inaktivierungsmechanismen: N- und C-Typ Inaktivierung

Beide Formen der Inaktivierung können nur beim zuvor durch Depolarisierung der Zellmembran aktivierten K_v-Kanal stattfinden, d.h. nur im aktivierte Zustand sind die beteiligten Bereiche des Proteins zugänglich (Yellen 1998). Die N-Typ Inaktivierung bedingt das extrazelluläre Vorhandensein eines geeigneten Inaktivierungspeptids am N-Terminus des K_v-Proteins oder einer gebundenen Kv_β-Untereinheit mit IP. Die oft ungefaltet vorliegenden Ballpeptide, die nur geringe Sequenzhomologie aufweisen, treten auf der intrazellulären Seite der Membran in Wechselwirkung mit dem Transmembranteil. Dies wurde bei elektrophysiologischen Messungen mit Kanalblockern vom TEA-Typ nachgewiesen, die intrazellulär appliziert die N-Typ Inaktivierung verhindern können (Yellen 1998). Ursprünglich wurde ein Verstopfen des Ionenkanals durch das Ballpeptid postuliert, was inzwischen aber kontrovers diskutiert wird (MacKinnon 2005; Baker Wüthrich Choe 2006).

Dabei konnte aber noch keine genaue Bindestelle des IP bestimmt werden (MacKinnon 2005), auch eine indirekte Übertragung einer Konformationsänderung nach der Bindung des Inaktivierungspeptids an die T1-Domäne des Kanalproteins oder eine Beteiligung der T1-Domäne an der Stabilisierung der Bindung des IP (preinactivation binding pocket) ist denkbar (Baker, Wüthrich & Choe 2006).

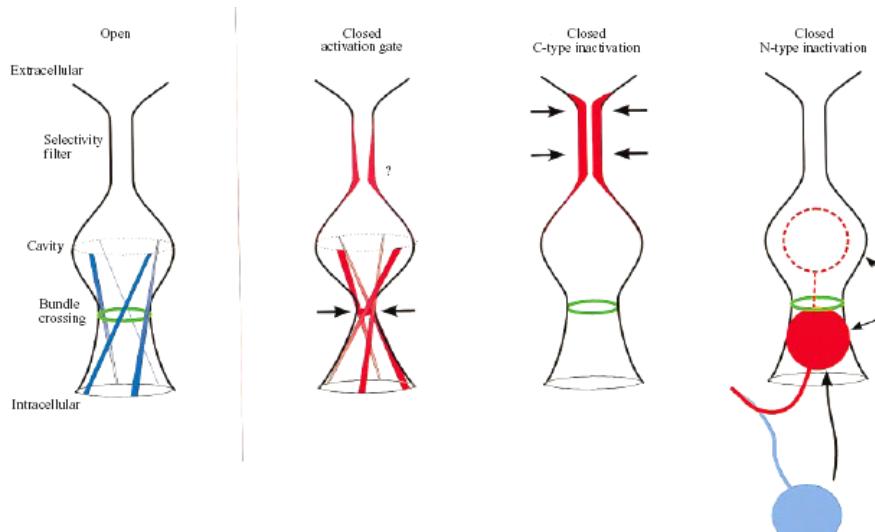


Abb. 1.15: Inaktivierungsmechanismen (Yellen 1998) Die verschiedenen Möglichkeiten der Inaktivierung bei Kaliumkanälen sind schematisch dargestellt. Von links nach rechts: geöffneter Kanal, durch den Kanalöffnungsmechanismus (gate) geschlossener (deaktiverter) Kanal, C-Typ Inaktivierung durch Konformationsänderung des Selektivitätsfilters und N-Typ Inaktivierung durch das Inaktivierungspeptid.

Die C-Typ Inaktivierung ist nur bei fehlender N-Typ Inaktivierung detektierbar, z.B. bei Kanalproteinen die kein eigenes IP tragen oder nach Deletion des IP. Dieser Typ der Inaktivierung erfolgt wesentlich langsamer als die N-Typ Inaktivierung und kann durch extrazellulär applizierte Kanalblocker beeinflusst werden. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass dieser Mechanismus vor allem durch relativ geringe Veränderungen der Struktur des Selektivitätsfilters bedingt ist, die durch Ursachen wie eine unphysiologisch niedrige K^+ Ionenkonzentration verursacht werden (Yellen 1998). Für einige der Mechanismen der C-Typ Inaktivierung, bei denen das Selektivitätsfilter mit dem P-Loop direkt beteiligt ist, wurde auch der Begriff P-Typ Inaktivierung geprägt.

1.5.5 Lokalisation und Funktion ausgewählter K_v 1 und K_v 3 Kanäle

Diese Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit der T1 Domäne des *shaker*-ähnlichen Kaliumkanals K_v 1.4. Im weiteren wurden auch Untersuchungen an K_v 1.3 und K_v 3.4 durchgeführt. K_v 1.4 und K_v 3.4 sind die einzigen K_v Kanäle bei Säugetieren, die ein eigenes funktionelles Inaktivierungspeptid besitzen. K_v 1.4 findet sich hauptsächlich in neuronalen Geweben, Skelett- und Herzmuskelzellen während K_v 1.3 neben verschiedenen Hirnregionen

auch in Zellen des Immunsystems und des Bindegewebes exprimiert wird und einen wichtigen Angriffspunkt für Immunsuppressiva bildet (Beeton & Chandy 2005). $K_v3.4$ findet sich im Gehirn und sekretorischen Organen sowie der Skelettmuskulatur.

Im Laufe der Zeit wurde die Expression der verschiedenen Kanäle in diversen Geweben nachgewiesen, wobei Knockout-Mausmodelle zum besseren Verständnis ihrer Funktion beitragen. Durch die häufig beobachtete Heterotetramerisierung ist es schwierig die Funktion eines bestimmten Kanals *in vivo* zu bestimmen. Sind die Partner der Heterotetramerisierung und die Stoichiometrie des Tetramers nicht bekannt, kann zwar die Spannungscharakteristik des Kanals nach heterologer Expression in *Xenopus*-Oocyten oder geeigneten Zellkultur-Modellen ermittelt werden, eine vollständige Entsprechung *in vivo* findet sich aber oft nicht. In der nachfolgenden Tabelle sind die wichtigsten Erkenntnisse über die jeweiligen Kanäle zusammengefasst (Gutman 2005).

Tab.1.6: Vorkommen und Funktionen von $K_v1.3$, $K_v1.4$ und $K_v3.4$, das Vorkommen der Kanäle ist in der Reihenfolge der Häufigkeit aufgelistet. (Gutman 2005)

Kanal	Vorkommen	Funktion
$K_v1.3$ delayed rectifier	Gehirn, Lunge, Inselzellen, Thymus, Milz Lymphknoten, Fibroblasten, B- und T-Lymphozyten, prä-B Zellen, Rachenmandeln, Makrophagen, Mikrogliazellen, Oligodendrozyten, Osteoklasten, Blutplättchen, Hoden	Regulation des Membranpotentials und des Kalzium Signaling in Lymphozyten und Oligodendrozyten Therapeutisches Ziel für Immunsuppressiva (Therapie von Multipler Sklerose im Tiermodell)
$K_v1.4$ schnellaktivierend	Gehirn, Lungentumoren, Skelettmuskulatur, Herzmuskel, Pankreas-Inselzellen	Repolarisierung nach Aktionspotential bei Neuronen, bei Ratten erhöhte Expression nach Myocardinfarkt und Induktion von Diabetes
$K_v3.4$ schnellaktivierend	Nebenschilddrüse, Prostata, Gehirn (Hirnstamm, Hippocampus), Skelettmuskulatur, Pankreas	Regulation des Ruhepotentials der Skelettmuskulatur

1.6 Stand der Forschung

Aufgrund der Bestimmung zahlreicher Kristallstrukturen, sind strukturelle Informationen über diejenigen Domänen der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle verfügbar, die eine stabile Struktur aufweisen. So sind die Strukturen des Selektivitätsfilters und der Pore, der T1 Domäne und der daran gebundenen β -Untereinheit weitgehend aufgeklärt. Über die häufig ungefalteten N- und C-Termini der Proteine und vor allem ihre Wechselwirkungen mit der T1

Domäne und der zentralen Transmembran-Porendomäne ist verhältnismäßig wenig bekannt. Nur bei einigen wenigen Inaktivierungspeptiden wie K_v1.4 und K_v3.4 konnte eine Struktur oder zumindest Sekundärstrukturelemente nachgewiesen werden (Wissmann 2003; Antz, Kalbitzer 1997).

Die von MacKinnon et al. gelöste Kristallstruktur des K_v1.2 Proteins im Komplex mit der K_vβ₂-Untereinheit (Long, MacKinnon 2005) zeigt erstmals die räumliche Korrelation von T1-Domäne und Transmembrandomäne. Leider ist die Auflösung mit 2,9 Å relativ gering. Informationen über die Lage des 31AS großen N-Terminus des Proteins (ein funktionelles IP ist nicht bekannt) und den C-Terminus nach Ende der S6 Helix (78AS) sind in der Struktur nicht enthalten, sie werden als ungeordnet beschrieben. Auch die T1-S1 Linkerregion konnte aus der Kristallstruktur nicht näher bestimmt werden, sie ist im Strukturmodell durch zwei Polyglycin Helices modelliert. Die Struktur ermöglicht dennoch eine Orientierung über die räumlichen Verhältnisse im Bereich des Übergangs vom Poreneingang zur T1-Domäne. Zwischen den radial nach außen weisenden Linkern ergeben sich vier von den Autoren als Portale bezeichnete Öffnungen, die mit einer Größe von 15-20 Å für den Durchtritt von K⁺ Kationen mehr als ausreichend sind. Im direkt angrenzenden Bereich der C-terminalen Helix der T1 Domäne sind zahlreiche negative Oberflächenladungen vorhanden. Neben der Attraktion der Kaliumionen wird hier auch eine mögliche Wechselwirkung mit dem IP vermutet.

Neue Untersuchungen von Baker et al. (Baker, Wüthrich & Choe 2006) weisen auf eine Interaktion des Inaktivierungspeptids bzw des IP-T1 Linkers mit der T1-Domäne hin. Durch den Vergleich von ¹⁵N ¹H TROSY NMR-Spektren zweier Konstrukte der N-terminalen Domäne des AK_v1.1 Kanals, von denen eines IP und Linker (zusammen 65AS) trägt und das andere nur aus der T1 Domäne besteht, konnten insgesamt sechs Aminosäurereste der T1 Domäne identifiziert werden, die Signalveränderungen bei Anwesenheit des IP und des Linkers zeigen.

Diese Reste befinden sich in der Furche zwischen zwei T1 Monomeren, wobei vier Reste zum einen und zwei Reste zum anderen Monomer gehören und zusammen eine fast durchgehende Interaktionsfläche bilden. Für drei der Residuen konnte in nachfolgenden Mutationsstudien ein deutlicher Einfluss auf die Kinetik von Inaktivierung und Recovery der Kanäle gezeigt werden. Dabei war die Inaktivierung im Vergleich mit dem Wildtyp verzögert, bei schnellerem Recovery. Eine Interaktion des IP oder des IP-T1 Linkers, die zu einer Art Positionierung des IP führt, scheint damit wahrscheinlich.

Eine derartige Positionierung könnte auch den Ergebnissen einer Reihe elektrophysiologischer Untersuchungen von Mathew et al. zugrunde liegen (Sankaranarayanan & Mathew 2005). In Experimenten mit einer Reihe von Konstrukten des humanen K_v1.4 Kanals, die entweder eine vollständige C-terminale Domäne oder einen

verkürzten C-Terminus besaßen, oder deren C-Terminus durch den anderer K_v1 Kanäle ausgetauscht war, konnten deutliche Unterschiede in der Kinetik der Inaktivierung und des Recovery beobachtet werden. Die Anwesenheit einer möglicherweise helikalen Sequenz im C-Terminus des K_v1.4 Kanalproteins führte zu einer Stabilisierung des inaktivierten Zustands des Kanals. Dies weist auf eine Beteiligung der C-Terminalen Domäne am Mechanismus der schnellen Inaktivierung hin, zumal eine Beteiligung der Transmembrandomäne an den beobachteten Effekten ausgeschlossen werden konnte.

1.7 Proteininfaltung

Wie alle (Bio-)Moleküle nehmen auch Proteine aufgrund thermodynamischer Gesetzmäßigkeiten einen möglichst energiearmen Zustand an. Bei Proteinen in wässriger Lösung, die in der Lage sind, einen hydrophoben Core auszubilden, bedeutet dies im Idealfall, dass ein kompakter Faltungszustand angenommen wird. Dabei weisen hydrophobe Seitenketten der Aminosäuren nach innen während Wassermoleküle aus dem Inneren des Proteins ausgeschlossen werden.

Kleine Peptide oder Proteine, die stark hydrophil sind oder deren Aminosäuresequenz viele geladene Aminosäuren aufweist, können jedoch keinen hydrophoben Core ausbilden und liegen oft nicht oder nur teilweise gefaltet vor.

Entgegen der ursprünglichen Annahmen, nach denen nur ein gefaltetes Protein eine Enzymaktivität besitzt oder eine andere z.B. strukturelle Funktion erfüllen kann, ist ein ungefaltetes Protein oder eine ungefaltete Domäne nicht notwendigerweise ohne Funktion. Oft wird die Ausbildung der Struktur eines Proteins erst durch die Wechselwirkung mit einem Bindungspartner, z.B. einem anderen Protein veranlasst. Dieser Vorgang wird als Induzierte Faltung bezeichnet. Es wird heute geschätzt, dass bis zu 30% aller zytosolischen Proteine ungefaltet vorliegen.

Die Faltung eines Proteins stellt einen cooperativen Prozess der Wechselwirkung eines Proteins mit seiner Umgebung dar. Daher ist es oft schwierig, die für eine korrekte Faltung *in vitro* notwendigen Bedingungen zu ermitteln. Proteine oder Proteindomänen, die in ihrem nativen Zustand im Komplex mit anderen Proteinen vorliegen oder beispielsweise mit Membranen assoziiert sind, stellen hier eine besondere Herausforderung dar. Bei der Rückfaltung solcher Proteine beispielsweise nach der denaturierenden Aufreinigung aus Inclusion Bodies sind außer den üblicherweise zur Pufferung der Lösung und zur Einstellung der notwendigen Ionenstärke erforderlichen Salzen oft auch Detergentien oder weitere Zusätze erforderlich (Rudolph et al. 1997), um die natürliche Umgebung des Proteins zu ersetzen.

1.8 NMR Spektroskopie an Proteinen

Die NMR-Spektroskopie bietet neben der sequentiellen Zuordnung der Signale (Wüthrich 1986) und der darauf aufbauenden Proteinstrukturberechnung vor allem die Möglichkeit, das Verhalten der Proteine unter Bedingungen zu untersuchen, die der nativen Umgebung des Proteins sehr nahe kommen. Im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse können die Messbedingungen innerhalb gewisser Rahmenbedingungen frei gewählt werden. Die Proteine liegen zur Messung frei beweglich in wässriger Lösung vor, Salzgehalt, pH-Wert und mögliche Additive wie Reduktionsmittel oder konservierende Agentien können variiert werden.

Auch die Zugabe von Wechselwirkungspartnern der Proteine, also beispielsweise Substrate oder Substratanaloga für Proteine mit enzymatischer Aktivität, interagierende Peptide oder Proteine als Bindungspartner von Strukturproteinen etc. ist einfach möglich, anschließend sind erneute Messungen mit derselben Probe möglich. So können vollständige Titrationsreihen erstellt werden, die Informationen über Interaktionsflächen der Proteine oder Kinetiken einer Wechselwirkung liefern können.

Die Auflösung der aufgenommenen NMR-Spektren ist neben der Feldstärke des zur Verfügung stehenden Spektrometers und seiner technischen Ausstattung (z.B. Cryoprobenkopf) abhängig von der Größe des zu beobachtenden Moleküls (Proteins). Bei zunehmender Größe tritt neben der Überlagerung von Signalen mit ähnlicher chemischer Verschiebung auch eine Verbreiterung der Signale aufgrund der durch die langsamere rotatorische Korrelationszeit verkürzten transversalen Relaxationszeiten (T_2).

Bei Proteinen mit einer molaren Masse von weniger als 15 kDa kann eine Strukturbestimmung allein anhand zweidimensionaler homonuclearer Protonenspektren, üblicherweise 2D NOESY, TOCSY und COSY Spektren durchgeführt werden. Bei größeren Proteinen sind in der Regel heteronukleare Spektren erforderlich. Dazu werden ^{15}N und ^{13}C isotopenmarkierte Proben verwendet, da die natürlich vorhandenen Isotope ^{14}N und ^{12}C nicht magnetisch aktiv sind. Markierte Proben erhält man, indem die zu untersuchenden Proteine heterolog in Bakterien oder Hefen exprimiert werden, denen nur entsprechend isotopenreine Substrate als N- und C-Quelle zur Verfügung stehen. Nach Aufreinigung der Proteine können 2D HSQC Spektren aufgenommen werden.

Beträgt die Masse des Proteins mehr als etwa 35 kDa, reicht die Auflösung zweidimensionaler Spektren nicht mehr aus, da zum einen wegen der höheren Anzahl an Aminosäureresten verstärkt Überlagerungen auftreten und zum anderen aufgrund der Masse des Moleküls die Signale verbreitert sind. Durch die Einführung der Tripelresonanzspektren konnten mit der Verwendung einer weiteren Dimension die Signale entzerrt und

Überlagerungen aufgelöst werden. Normalerweise werden für eine sequentielle Zuordnung das HNCA und das HN(CO)CA Spektrum verwendet.

Durch die Entwicklung der TROSY-Spektren (Pervushin, Wüthrich et al. 1997; Pervushin 2000) konnte die Auflösung erneut verbessert werden. Bei weiter zunehmender Größe der Proteine ist zusätzlich die Perdeuterierung der Proteine durch die Expression in Medium mit D₂O statt Wasser als Lösungsmittel erforderlich. Hierdurch wird eine Veminderung der Protonendichte erreicht, die die Relaxation vermindert. Außerdem werden bei Verwendung geeigneter Pulsprogramme nur noch ¹⁵N Protonen detektiert, die mit dem wässrigen Lösungsmittel austauschen.

Da die isotopenreinen Substrate relativ kostenintensiv sind, ist eine sorgfältige Vorbereitung und Optimierung der Proteinexpression und -aufreinigung erforderlich, um wirtschaftlich zu arbeiten.

Ein Sonderfall bei den großen Proteinen stellen Homooligoimere dar. Solange nur ein Oligomerisierungszustand vorliegt und nicht eine Mischung verschiedener Oligomere, die miteinander im Gleichgewicht stehen und alle Monomere in der gleichen Konformation vorliegen, wird nur ein Satz von Signalen beobachtet, der einem Monomer entspricht. Die Linienverbreiterung entspricht jedoch der Masse des Oligomers, da ja nur dieses in der Lösung frei diffundieren kann.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Nachdem die Struktur und Funktion des Selektivitätsfilters und die Funktion des Kanalöffnungsmechanismus der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle vor allem elektrophysiologisch inzwischen gut erforscht sind, und auch die Grundlagen der schnellen Inaktivierung durch das Inaktivierungspeptid (IP) aufgeklärt sind, wendet sich das Interesse zunehmend den molekularen Grundlagen der beobachteten Effekte zu. Vor allem die Tetramerisierungsdomäne mit ihren möglichen regulatorischen Funktionen durch Wechselwirkungen mit den weiteren cytosolischen Domänen des Kanals steht dabei im Zentrum des Interesses. Während die T1 Domänen innerhalb der Unterfamilien der K_v Kanäle eine hohe Sequenzidentität aufweisen, besteht im Bereich der N-terminalen Sequenzabschnitte von IP und zugehörigem Linker sowie im Bereich des ebenfalls cytosolischen C-Terminus der Proteine eine hohe Variabilität in der Länge und Sequenz der Domänen. Diese variablen Sequenzabschnitte werden mit den zum Teil sehr unterschiedlichen Kanalöffnungs- und Inaktivierungseigenschaften der sonst sehr ähnlichen Kanalproteine in Verbindung gebracht.

Ziel dieser Arbeit ist es, erstmals ein System von Proteinkonstrukten zu etablieren, das eine direkte Untersuchung der Interaktionen der T1 Domäne eines schnellinaktivierenden spannungsgesteuerten Kaliumkanals mit diesen variablen Bereichen des Proteins ermöglicht und anschließend die entsprechenden Experimente durchzuführen. Die Anwendung der Kernmagnetresonanzspektroskopie (NMR) ermöglicht die Beobachtung sowohl gefalteter als auch ungefalteter Proteine und Peptide unter variablen Bedingungen, die der nativen Umgebung des Proteins und seinen Löslichkeitseigenschaften angepasst werden können. Auch die Interaktionen der Proteinkonstrukte untereinander sind mit NMR-Methoden detektierbar.

Als Basis für die NMR Untersuchungen werden Proteinkonstrukte benötigt, die neben den für die Untersuchungen benötigten Sequenzabschnitten auch über eine ausreichende Stabilität in Lösung verfügen und dabei ihre native Struktur annehmen. Darüber hinaus sollten die Proteinkonstrukte, deren Interaktionen untersucht werden sollen, die gleichen Lösungsbedingungen besitzen, um Artefakte zu vermeiden.

Da vor allem die schnelle Inaktivierung untersucht werden soll, wurden als Zielproteine der Arbeit vor allem K_v Kanalproteine ausgewählt, die über ein elektrophysiologisch funktionelles und bereits in der NMR strukturell charakterisiertes Inaktivierungspeptid verfügten. Die bereits vorhandenen oder während dieser Arbeit klonierten Konstrukte waren hinsichtlich ihrer heterologen Expression, Aufreinigung und Lösungsbedingungen zu optimieren. Als Grundlage für die Untersuchung von Interaktionen der Domänen werden TROSY-HSQC-Spektren benötigt, die eine sequentielle Zuordnung der erhaltenen Signale im NMR-Spektrum ermöglichen. Bei größeren oder multimeren Proteinkonstrukten ist dazu die Aufnahme dreidimensionaler Spektren von ^{15}N - und ^{13}C -markierten Proteinproben erforderlich.

Nach diesen vorbereitenden Arbeiten sollen Untersuchungen der Wechselwirkungen der T1 Domäne mit den räumlich benachbarten N- und C-terminalen cytosolischen Domänen durchgeführt werden, um die molekularen Grundlagen der in vielen elektrophysiologischen Experimenten beobachteten Effekte zu entschlüsseln. Dazu sollen NMR-Titrationsexperimente durchgeführt werden, die eine direkte Beobachtung der einzelnen Aminosäuren der Konstrukte ermöglichen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Geräte

Magnetrührer Heidolph MR 3001K
pH-Meter Beckmann Φ 32
Vortex Genie2 Scientific Industries
Biofuge pico Heraeus Instruments
Zentrifuge Hettich Universal 30 RF
Zentrifugen Beckman Avanti™ J20 und J25
Mikroliterpipetten: Gilson Pipetman Serie
Milli-Q Reagent water System: Millipore Continental Water Systems (Molsheim/Frankreich)
Analysenwaage Sartorius BP61S
Feinwaage Mettler PM600
Gefrierschrank (-80°C) Jouan Series 2 VX530
Glasgeräte: Schott Duran
Sterilarbeitsbank Jouan MSC 12
PCR-Gerät Eppendorf Mastercycler personal
Inkubator: Jouan
Schüttelinkubator Infors HAT (Infors, Bottmingen/Schweiz)
Netzgerät Biorad Power Pac 300
Zentrifuge: Beckman Model J-6B centrifuge
Apparatur für SDS-PAGE cti
Horizontalschüttler Heidolph Promax 1020
Spectrophotometer Beckman DU® 640
Peristaltikpumpe: Minipuls3 Abimed/Gilson
Leersäulen für die Ni-NTA Affinitätsreinigung: Werkstatt Biologie, Universität Regensburg

FPLC-Anlage: ÄKTAfplc™ (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)

NMR-Spektrometer: Bruker Avance 600 MHz mit Cryoprobe TXI Avance Pobenkopf (Bruker Biospin GmbH, Karlsruhe)

2.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Reagentien wurden von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Gerbu (Gailberg), Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen), Carl Roth (Karlsruhe), und United States Biochemical (Cleveland, USA) bezogen. Verwendet wurde, wenn nicht gesondert angegeben, die jeweils höchst verfügbare Reinheitsstufe.

Isotopenreine Chemikalien $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, ^{13}C -Glucose und D_2O (99%) wurden bezogen von Spectra Stable Isotopes, Columbia, MD, USA.

Thrombinprotease: Merck KGaA (Darmstadt)

2.1.3 Wichtige Verbrauchsmaterialien

Konzentratoren für Ultrafiltration:

Centricon Plus-20 (Amicon Bioseparations/Millipore Corporation, Bedford, USA)

Membran: Ultracel PL (Zelluloserestivat); MWCO 10.000

Vivaspin 2, 6, 20 (Vivascience, Sartorius Group, Göttingen)

Membran : PES (Polyethersulfonsäure) MWCO 10.000 und 5.000

Dialysierschlüche:

Cellutrans Roth MWCO 8-10.000 , regenerierte Cellulose (Carl Roth GmbH Karlsruhe)
(5x in Millipore H_2O ausgekocht; Lagerung in 20% EtOH)

Sterilfiltration :

Steritop Flaschenaufsatzfilter: Millipore Corporation, Bedford, USA

2.1.4 Fertigsäulen und Säulenmaterial für die Proteinreinigung

Fertigsäulen für die Gelfiltration (GE Healthcare, Uppsala, Schweden):

Säule	Bettvolumen	Material	Trennbereich
HR 10/30	24 ml	Superdex 75	3-70 kDa
Hiload 16/60	120 ml	Superdex 75 prep grade	3-70 kDa
Hiload 16/60	120 ml	Superdex 200 prep grade	10-600 kDa

Säulenmaterial für His-Tag Affinitätsreinigung:

Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden)

Selbstgepackte Säulen, Bettvolumen je nach Anwendung 1 ml bis 55 ml.

2.1.5 Proteinstandards

Für die Shägger-Gele wurde der Dalton Mark VII-L Proteinstandard (Sigma) eingesetzt

Der selbst zusammengestellte Proteinstandard für analytische Gelfiltrationen besteht aus:

<u>Substanz</u>	<u>Molare Masse (kDa)</u>	<u>Konzentration (mg/ml)</u>
Immunglobulin G	150	3,0
Transferrin	81	3,0
Ovalbumin	43	3,0
Myoglobin	17	3,0
Aprotinin	6,5	3,0
Vitamin B ₁₂	1,35	0,5

Für die NMR-Diffusionsmessung wurde neben Polyacrylamid (Roth), Vitamin B₁₂ und Transferrin auch RNAse A (17,4 kDa) eingesetzt.

Alle in den Standards eingesetzten Proteine und Referenzsubstanzen wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, von Sigma (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) bezogen.

2.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen**2.2.1 Puffer-Stammlösungen****Natriumphosphatpuffer:**

Stammlösungen 1 M Na₂HPO₄ und 1 M NaH₂PO₄, der jeweils benötigte pH-Wert wird durch Mischen der Lösungen eingestellt. (Kurzbezeichnung NaP_i).

Kaliumphosphatpuffer:

Stammlösungen 1 M K₂HPO₄ und 1 M KH₂PO₄, der jeweils benötigte pH-Wert wird durch Mischen der Lösungen eingestellt. (Kurzbezeichnung KP_i).

Kaliumacetatpuffer

Stammlösungen 1 M Essigsäure und 1 M Kaliumacetat, der jeweils benötigte pH-Wert wird durch Mischen der Lösungen eingestellt.

Tris-Puffer:

Stammlösung 1M Tris-Base, pH-Wert wird durch Titration mit 25% HCl (p.a.) eingestellt.

2.2.2 Puffer für Ni-NTA System**Basispuffer** (Verändert nach QIAexpressionistTM, Qiagen, Hilden)

GdmHCl	6 M
NaH ₂ PO ₄	100 mM
Tris	10 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM
Imidazol	5 mM

Alle Puffer werden vor dem Einstellen des pH-Werts mit β-Mercaptoethanol ad 10 mM im Endvolumen versetzt, der pH-Wert wird mit 10 M NaOH bzw. HCl eingestellt:

Puffer A:	Lysepuffer	pH 8,0
Puffer C:	Waschpuffer	pH 6,3
Puffer D:	Waschpuffer	pH 5,9
Puffer E:	Elutionspuffer	pH 4,5

2.2.3 Rückfaltungspuffer**Rückfaltungspuffer für K_v3.4 Konstrukte (pH je nach Angabe)**

TDZ: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10mM DTE und 1 mM ZnSO₄

bei Rückfaltung pH 9,0 NMR Messung bei pH 8,0

TDE: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10mM DTE und 5 mM EDTA

KDZ: 100 mM Kaliumacetat, 10 mM DTE und 1 mM ZnSO₄

pH 4,5 (Rückfaltung und NMR Messung)

Rückfaltungspuffer für K_v1 Konstrukte

KP_i: 150 mM Kaliumphosphat pH 6,5

(bei cysteinhalten Konstrukten zusätzlich 10 mM DTE)

2.2.4 Sonstige Stammlösungen

EDTA: 0,5 M EDTA eingestellt mit KOH oder NaOH je nach weiterer Verwendung auf pH 8,0

2.3 Materialien und Medien für die Proteinexpression

2.3.1. *E. coli* Stämme

RosettaTM(DE3)pLysS (Novagen)

E.coli B F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm lacY1* (DE3) pLysSRARE (Cm^r)

BL21(DE3) (Novagen)

E.coli B F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm* (DE3)

Das verwendete Expressionsystem basiert auf dem *lac*-Operon, die klonierten Genfragmente stehen unter der Kontrolle des *lac*-Inhibitors, der im Plasmid enthalten ist und werden durch die T7 RNA Polymerase transkribiert. Die Induktion erfolgt über IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid), ein nicht verstoffwechselbares und membrangängiges Galaktoseanalogon (Dubendorff et al. 1991).

Die RosettaTM Proteinexpressionsstämme tragen auf einem als pRARE bezeichneten Plasmid die Sequenzen zusätzlicher tRNAs, die eine Reihe von bei *E.coli* relativ selten genutzten Codons erkennen. So können die bei Säugern häufig vorkommenden Codons in der Proteinexpression ohne Verzögerung erkannt werden, ein Stocken oder gar Kettenabbruch wird vermieden. Die Proteinexpression wird so bei Konstrukten, die viele seltene Codons enthalten, deutlich verbessert (Dong et al. 1996).

2.3.2 Kulturmedien

TB Medium (Terrific Broth) (Tartof & Hobbs 1987)

Bacto-Tryptone	12 g	
Bacto-yeast extract	24 g	H ₂ O (Millipore) ad 900ml
Glycerin	4 ml	autoklavieren

<u>TB-Puffer:</u>	K ₂ HPO ₄	0,72 M	
	KH ₂ PO ₄	0,17 M	autoklavieren

Nach dem Abkühlen werden je 900ml Medium 100ml Puffer zugegeben.

NMM (New Minimal Medium) nach S. Wohlgemuth (Geyer et al.1997) verändert

<u>Minimalmedium:</u>	Na ₂ HPO ₄	7,5 g	
	KH ₂ PO ₄	3,0 g	
	NaCl	0,5 g	
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25 g	H ₂ O (Millipore) ad 900 ml
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,014 g	autoklavieren

<u>SL-6Stammlösung:</u>	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	100 mg	
	MnCl ₂	30 mg	
	H ₃ BO ₃	300 mg	
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	200 mg	
	CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg	H ₂ O (Millipore) ad 1 L,
	NiCl x 6 H ₂ O	20 mg	sterilfiltrieren
	Na ₂ MoO ₄	30 mg	(bei 4 °C lagerfähig)

<u>10 x SL-4:</u> Stammlösung	EDTA	500 mg	
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	200 mg	
	H ₂ O (Millipore) ad 90 ml (immer frisch ansetzen)		

<u>SL-Mix:</u>	SL-6	1,0ml	
	10 x SL-4	0,9ml	
	H ₂ O (Millipore) ad 10ml, sterilfiltrieren		

Ansatz für 1L gebrauchsfertiges MM:

Minimalmedium	900 ml	
SL-Mix	10 ml	
Glucose 200 mg/ml (sterilfiltriert)	20 ml (= 4 g/L)	
NH ₄ Cl 200 mg/ml (sterilfiltriert)	5 ml (= 1 g/L)	H ₂ O (Millipore, steril) ad 1 L

Speziell für die Medienherstellung mit D₂O ergeben sich folgende Änderungen des Protokolls:

Da nicht autoklaviert werden kann, werden Medium und 10x SL4 Lösung direkt mit D₂O (99%) angesetzt und sterilfiltriert, das SL Mix mit D₂O statt H₂O aufgefüllt. Der Wassereintrag durch die Verwendung der wässrigen SL6 Lösung ist vernachlässigbar. Auch IPTG und Antibiotika wurden in wässriger Lösung zugesetzt, Glucose und Ammoniumchlorid jedoch als Feststoff vor der Sterilfiltration (Steritop-Filter, Millipore) zugegeben. Das Medium wurde sofort verbraucht, kleinere Aliquots für Vorkulturen bei -20 °C gelagert und bei Bedarf aufgetaut.

Antibiotika-Stammlösungen (nach Mühlhard 1999)

<u>Stammlösungen sterilfiltriert</u>		<u>Arbeitskonzentration</u>
Carbencillin(Cb)	50mg/ml in H ₂ O	25µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	34mg/ml in Ethanol	68µg/ml
Kanamycin (Kan)	30mg/ml in H ₂ O	30µg/ml

2.4 Molekularbiologische Materialien und Methoden

Die Klonierung der verkürzten K_v3.4 T1 Konstrukte erfolgte analog zu den während meiner Diplomarbeit durchgeführten Klonierungen (Schreier 2002). Im Folgenden sind nur die verwendeten spezifischen Restriktionsendonukleasen sowie alle während dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Expressions- bzw. Vermehrungsstämme aufgeführt.

Restriktionsendonukleasen: Nde I, und Hind III, NewEngland Biolabs, Beverly USA

Hilfsstamm für Plasmidvermehrung : *E.coli* DH5 α

Plasmide (Novagen/Merck Biosciences):

pET 20b+	(alle T1 Konstrukte)
pET 19b	(K _v 1.4 C84 Konstrukt)
pET 41a	(K _v 1.4 IP Konstrukt)

2.5 Proteinbiochemische Standardmethoden

2.5.1 SDS-PAGE nach Shägger & von Jagow und Nativgele

Zur Kontrolle der Proteinreinigung wurde an Stelle der meist üblichen denaturierenden diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (Lämmli 1970) die Methode nach Shägger und von Jagow (Shagger 1987) eingesetzt, da sie bei der relativ geringen Größe der hier im denaturierten Zustand immer monomer vorliegenden Proteine eine bessere Auftrennung bietet. Die Acrylamidkonzentration betrug im Sammelgel 4,1 %, im Trenngel 16,5 %. Als Anodenpuffer werden 200 mM Tris/HCl pH 8,9 eingesetzt, der Kathodenpuffer enthält 100 mM Tris/HCl, 100 mM Tricin und 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,25. Die Gelelektrophorese wurde bei Gelen der Größe 6x9 cm bei konstanter Stromstärke von 40 mA und einer Dauer von ca. 75 min durchgeführt. Die Detektion der Proteinbanden erfolgt durch Coomassie Blau Färbung analog zur Lämmli Methode.

TCA-Fällung guanidinhaltiger Proben

Da sich Proteinproben in guanidinhaltigen Puffern nicht für die Gelelektrophorese eignen werden sie zunächst mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt, das Pellet in H₂O gewaschen und in Probenpuffer aufgenommen:

50 µl Probe werden mit 450 µl H₂O aufgefüllt und mit 75 µl TCA (50% in H₂O) versetzt. Nach vortexen wird 5 min auf Eis inkubiert, anschließend das Präzipitat abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 450µl H₂O gewaschen und anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Nativgele

Wurden nach der Shägger-Methode aber ohne Zugabe von SDS durchgeführt. Da nur Proteine (K_v3 Konstrukte) untersucht wurden, die unter den in der Methode beschriebenen Bedingungen löslich waren, konnte die Methode sonst unverändert übernommen werden.

2.5.2 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie oder Gelfiltration wird vor allem zum Entsalzen oder Umpuffern von Proteinen, und zur Proteinreinigung eingesetzt. Dabei erfolgt eine Auftrennung der Proteine, die nur vom hydrodynamischen Radius des Proteins abhängig ist, da keine spezifische Interaktion des Proteins oder anderer zu trennender Makromoleküle mit der Säulenmatrix erfolgt. Die Säulenmatrix, ein quervernetztes Dextran, bildet poröse Partikel. Zu große Moleküle bewegen sich im Ausschlussvolumen, verlassen die Säule also zuerst wieder, während kleinere Moleküle sich auch durch die Dextranpartikel bewegen können und so länger auf der Säule verbleiben. So kann z.B. ein Proteingemisch aufgetrennt werden.

Mit einer FPLC-Anlage (ÄKTAfplcTM, GE Healthcare) sind auch analytische Gelfiltrationen möglich, da die Säulenläufe sehr gut reproduzierbar und damit auch gut vergleichbar sind. Da die verwendete Säulenmatrix durch ihre chemische Struktur weitgehend inert ist und ihre Eigenschaften sich in unterschiedlichen Puffern kaum verändern, können auch die Auswirkungen unterschiedlicher Puffersubstanzen oder Salzkonzentrationen auf ein Protein oder ein Proteinoligomer untersucht werden. Besonders die Beurteilung von Oligomerengemischen ist so gut möglich, da z.B. Gleichgewichtszustände zwischen unterschiedlich großen Oligomeren dargestellt werden können, die mit anderen Methoden nicht oder nur unvollständig erfasst werden können.

2.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (Bradford 1976) mit einer Coomassie Blue -haltigen Reagenzlösung (Coo Assay Reagent; Uptima, Frankreich; Roti®-Quant, Carl Roth, Karlsruhe), deren Blaufärbung nach Zugabe des Proteins bei 595 nm im Spektrophotometer gemessen wird. Die Eichung erfolgt mit der mitgelieferten BSA (Bovines Serumalbumin) Standardlösung.

2.5.4 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie nutzt die Absorption circular polarisierten Lichts im UV-Bereich. Da bei Proteinen die Absorption von den Sekundärstrukturelementen der Polypeptidkette abhängig ist, können so (Teil-)Denaturierungen eines Proteins durch Vergleich mit der Ausgangsprobe detektiert werden.

Die CD-Spektren wurden am Lehrstuhl von Prof. Dr. Sterner, Universität Regensburg, von Melanie Vollmer aufgenommen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei 20 °C, es wurden je 1 mg/ml des zu untersuchenden Proteinkonstrukts im zu testenden Puffer eingesetzt. Zusätzlich wurde jeweils ein Referenzspektrum der Pufferlösung aufgenommen.

2.5.5 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration wurde zur Einengung verdünnter Proteinlösungen vor allem nach Rückfaltungen und Gelfiltrationsschritten angewendet. Volumen und Ausschlussgröße der Ultrafiltrationseinheiten wurden jeweils der Arbeitssituation angepasst, vor allem der Gebrauch zu großer Einheiten führt sonst zu erheblichen Proteinverlusten durch Bindung an die Membran. Ultrafiltrationen wurden bei 4 °C und maximal (je nach Rotor und eingesetzter Zentrifuge) 6.000 g durchgeführt. Bei längeren Konzentrationsprozessen wurde vor allem bei oxidationsempfindlichen Proteinen das bereits aufkonzentrierte Protein aus dem Konzentratoren entfernt und unter Luftabschluss auf Eis gelagert, um die Proben zu schonen und die Dauer des Konzentrationsprozesses abzukürzen.

2.6 Proteinexpression

2.6.1 Kriterien für die Optimierung der Proteinexpression

Neben dem Einsatz der Rosetta™ Expressionsstämme, die bei der heterologen Expression in *E. coli* die Expression von eukaryotischen und insbesondere Säugetiergenen deutlich verbessern können, wurden auch physikalische Parameter entsprechend ausgetestet und angepasst. Die spezielle Vorgehensweise bei perdeuterierten Kulturen ist im Ergebnisteil unter 3.2.3.1 beschrieben. Generell wird mit vorgewärmten und durch Schütteln im Kulturschüttler bereits sauerstoffgesättigten Kulturmedien gearbeitet, dabei wird mit so dichten Vorkulturen angeimpft, dass nur noch maximal zwei Teilungszyklen der Bakterien bis zur Induktion nötig sind. Das Kulturmedium verfügt also bei der Induktion noch über ausreichende Ressourcen und ist möglichst wenig durch Stoffwechselprodukte der Bakterien

belastet, so dass optimale Bedingungen für die Proteinexpression erreicht werden. Bei Kulturen in Minimalmedium werden darüber hinaus Sauerstoffmangel- und Abkühlphasen durch häufiges Öffnen des Schüttlers, z. B. für OD-Messungen etc. soweit möglich vermieden, da diese das Kulturenwachstum deutlich verzögern. Alle Proteinexpressionen erfolgen bei 37 °C und 180 bis 200 U/min in maximal zu 20% gefüllten Erlenmeyerkolben, so dass eine optimale Belüftung gewährleistet ist.

2.6.2. Übersicht über die Expressionbedingungen der Konstrukte

Die beiden folgenden Tabellen geben eine Übersicht über die ermittelten Expressionsparameter für die einzelnen Konstrukte bzw. grundsätzliche Bedingungen, die vom Kulturmedium beeinflusst werden.

Konstrukt	Antibiotika	Ausbeute (mg) je 1 L TB Medium	Ausbeute (mg) je 1 L NMM Medium
K_v1.4 IP-GST Fusionsprotein	Cm Kan	420	--
K_v1.4 T1K	Cb Cm	150	60 (in D ₂ O ca. 40)
K_v1.4 C84	Cb Cm	120	50
K_v1.3T1KREE	Cb Cm	300	--
K_v3.4 165H	Cb Cm	120	ca. 30

Tab. 2.1: Dargestellt sind die durchschnittlichen Ausbeuten in der Expression der Konstrukte. Alle Konstrukte liegen im Expressionsstamm *E.coli* Rosetta™ pLysS (Novagen) vor. (Cb: Carbencillin, Cm: Chloramphenicol, Kan: Kanamycin).

Kultur-Medium	Generations-zeit [min]	Expressions-zeit [h]	IPTG-Konzentration [mM]	OD ₅₉₅ bei Induktion
TB	30	4-8	1,0	ca.1,3
NMM (auch mit ¹⁵N- oder ¹³C-markierung)	60	12-16	1,0	0,7-0,8
NMM in D₂O und 3x NMM	100-120	20-24	0,9	0,6-0,7

Tab 2.2: Expressionsparameter, die durch das Kulturmedium bedingt sind

2.7 Proteinreinigung, Rückfaltung und Löslichkeitsscreening

2.7.1 Reinigungsprotokoll für K_v His-Tag Konstrukte

Da alle Proteinkonstrukte gut exprimiert werden konnten, aber unlöslich in Einschlusskörperchen vorlagen, wurde die denaturierende Aufreinigung eingesetzt, da die Denaturierung und anschließende Rückfaltung (Rudolph et. al 1997) der Konstrukte ohnehin erforderlich war.

2.7.1.1 Denaturierende Aufreinigung durch Ni-NTA Affinitätschromatographie

Die Ni-NTA Affinitätschromatographie (Porath et al. 1975) ermöglicht in Verbindung mit einem 6x oder 10x Histidin-Tag (Hochuli 1989) eine sehr selektive Aufreinigung auch unter denaturierenden Bedingungen. Nach dem ersten Aufreinigungsschritt kann bereits zu 90% reines Zielprotein erhalten werden. Das eingesetzte Ni-NTA Superflow Säulenmaterial ist mechanisch sehr stabil und hat mit bis zu 10 mg/ml eine hohe Proteinbindekapazität. Daher eignet es sich auch gut für größer dimensionierte Aufreinigungen mit bis zu 500 mg Protein.

Denaturierende Ni-NTA Affinitätschromatographie:

(nach The QIAexpressionist™ 08/2002, QIAGEN GmbH, Hilden, modifiziert)

Die Affinitätsreinigung erfolgt entweder mit einer ÄKTAfplc™ Anlage bei 4°C oder mit Hilfe einer Peristaltikpumpe und manueller Fraktionierung des Eluats bei Raumtemperatur.

Die Lyse des *E. coli* Pellets erfolgt mit Puffer A pH 8.0 mit einer Puffermenge, die dem 10-fachen des Pellett-Nassgewichts entspricht. Die Lysedauer beträgt mindestens 3h oder ÜN bei RT unter kräftigem Rühren. Zur Klärung wird das Lysat bei 35.000 g 30 min bei RT zentrifugiert. Der Auftrag auf die Ni-NTA Superflow Säule (CV 10-55 ml je nach erwarteter Proteinmenge) erfolgt mit einer Flussrate von 1-2 ml/min, bei Waschen und Elution ist eine Steigerung auf 5 ml/min möglich. Die Säule wird mit Puffer C pH 6,3 gewaschen bis kein Protein mehr detektiert wird (im manuellen Verfahren 8-10 CV). Der stringentere Waschpuffer D, pH 5,9, ermöglicht die Entfernung von *E. coli*-Proteinen, die 3x oder 4xHis Elemente in ihrer natürlichen Sequenz besitzen und häufig als Verunreinigungen auftreten. Die Vorgehensweise entspricht Puffer C, wegen der geringeren Proteinmenge sind jedoch nur 1-2 CV notwendig. Die Elution des Fusionsproteins erfolgt mit Puffer E, pH 4,5; es werden ca. 2-3 CV benötigt.

Alle Fraktionen, die ausreichend sauberes Zielprotein enthalten, werden vereinigt und der Proteingehalt nach Bradford bestimmt. Anschließend kann die Lösung bei -20 °C gelagert werden.

2.7.1.2 Rückfaltung der Kv Konstrukte

Zur Rückfaltung der denaturierend aufgereinigten Proteinkonstrukte wurde ein standardisiertes Protokoll entwickelt. Nachfolgend ist die Version mit KP_i Puffer für die Kv1 Konstrukte dargestellt. Bei Kv1.4 T1K kann, da keine Cysteine enthalten sind, ohne DTE gearbeitet werden. Das Kv1.4 IP-GST Fusionsprotein wird, da anschließend bei pH 7,3 die Thrombinspaltung erfolgt, bei pH 7,3 zurückgefaltet.

Rückfaltungsdialyse:

Die Rückfaltung der Proteinkonstrukte erfolgt durch das schrittweise Absenken der Guanidinkonzentration im Puffer mittels Dialyse bei 4 °C. Zuvor wird auf einen reinen Phosphatpuffer umgepuffert und das β-Mercaptoethanol durch DTE ersetzt.

Ausgangspuffer (denaturierend):

Kaliumphosphatpuffer (KP_i) 150 mM, 20 mM DTE, 3M GdmHCl; pH 7,3

Rückfaltl puffer:

150 mM (KP_i), 20 mM DTE, pH 7,3

Das Eluat der Ni-NTA Affinitätschromatographie wird mit dem Ausgangspuffer auf 0,5-1 mg Protein / ml verdünnt und gegen das 10-20 fache Volumen dialysiert (Zellutrans Roth MWCO 10.000). Zur Equilibrierung wird 1 x 3 h gegen den Ausgangspuffer dialysiert.

Bei den folgenden Verdünnungsdialysen wird jeweils die Hälfte des Puffervolumens gegen Rückfaltl puffer ersetzt und jeweils 3h dialysiert. Bei den empfindlicheren T1-Konstrukten wird die Dialyse nicht schrittweise sondern im kontinuierlichen Verfahren (s. u.) durchgeführt.

Guanidinkonzentration nach den jeweiligen Dialysen:

Schritt 1	1500 mM GdmHCl
Schritt 2	750 mM GdmHCl
Schritt 3	375 mM GdmHCl
Schritt 4	188 mM GdmHCl

Die anschließende Stabilisierungsdialyse erfolgt 2 x 3 h gegen Rückfaltl puffer, danach wird ausgefallenes Protein durch Zentrifugation entfernt (35.000 g, 4 °C, 20 min), und der Überstand mit dem rückgefalteten Zielprotein auf ca. 4 mg/ml aufkonzentriert (Vivaspin 10.000 MWCO, PES Membran). Die Rückfaltausbeute liegt bei etwa 70-80%. Bei großen Teilen des Pellets handelt es sich um Verunreinigungen, d.h. andere Proteine, für die die Rückfaltbedingungen offenbar ungeeignet sind, das Fusionsprotein wird so bei der Rückfaltung gleichzeitig gereinigt.

2.7.1.3 Kontinuierliche Dialyse

Für die Konstrukte der K_v1 und K_v3 Tetramerisierungsdomänen wird das in 2.7.1.2 beschriebene Dialyseverfahren nicht durch stufenweises, schnelles Ausverdünnen des denaturierenden Agens durchgeführt, sondern das GdmHCl durch kontinuierliche Zugabe des GdmHCl-freien Rückfaltbufffers ausverdünnnt.

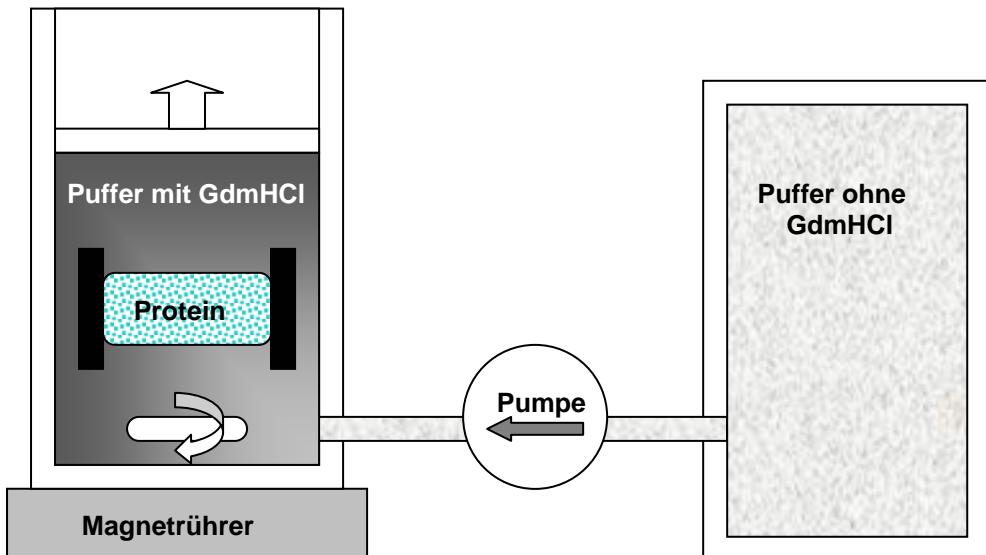


Abb. 2.1: Schematische Abbildung der Rückfaltapparatur für die T1 Domänenkonstrukte. Ein schwimmfähiger Deckel auf der Oberfläche der Pufferlösung verhindert den Kontakt zur Umgebungsluft und verringert so die Oxidation der Proteine bzw. des im Puffer enthaltenen DTE.

Dazu wird zunächst der Verdünnungsschritt 1 durchgeführt und dann über eine Pumpe der Rückfaltbuffer in der Rückfaltapparatur (Abb. 2.1) kontinuierlich zudosiert, bis die GdmHCl-Konzentration 300 mM unterschreitet. Dieser Vorgang erfolgt ÜN bei 4 °C, anschließend wird der Rückfaltprozess mit der Stabilisierungsdialyse fortgesetzt. Die K_v3.4 Konstrukte werden in den jeweils geeigneten Tris oder Kaliumacetatbuffern (siehe 2.2.3) zurückgefaltet und stabilisiert.

2.7.1.4 Nachreinigung und Umpuffern mittels Gelfiltration

Durch einen präparativen Gelfiltrationslauf mit einer jeweils geeigneten Superdex-Säule (Monomere Proteine Superdex 75, T1-Tetramere Superdex 200) werden die Konstrukte nachgereinigt und eventuelle GdmHCl Reste oder Proteinverunreinigungen entfernt. Auch durch Oxidation auftretende Dimere des K_v1.4 C84 Konstrukts können so beseitigt werden. Die Fraktionen, die reines Zielprotein enthalten werden vereinigt und auf die benötigte

Arbeitskonzentration aufkonzentriert. Nicht sofort verwendete Proteinproben werden aliquotiert, schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

2.7.2 Thrombinverdau und Nachreinigung des IP-Konstrukts

Das K_v1.4 IP-GST Fusionsprotein wird bereits vor dem Gelfiltrationsschritt durch Thrombinverdau gespalten. Sowohl der GST-Tag als auch die Protease können dann in der Gelfiltration entfernt werden. Eingesetzt werden 10 U Thrombinprotease (gelöst in H₂O/Glycerin 1:1) je mg Fusionsprotein. Der Verdauansatz wird bei RT unter vorsichtigem Schütteln 12-24 h inkubiert. Anschließend wird ausgefallenes Protein (fast ausschließlich GST-Tag) wie nach der Dialyse abzentrifugiert.

Der abzentrifugierte Verdauansatz wird entsprechend dem Auftragsvolumen der verwendeten Gelfiltrationssäule (Superdex 75) aufkonzentriert (Vivaspin 5.000 MWCO, PES). Die Gelfiltration wird mit KP_i 150 mM, 20 mM DTE, pH 6,5 als Laufpuffer durchgeführt und das IP so in den NMR-Messpuffer umgepuffert. Das Zielprotein (7,79 kDa) eluiert nach dem deutlich größeren GST-Tag (ca. 35 kDa), der eine sehr hohe UV-Absorption aufweist und daher sehr gut detektiert wird, und eventuell noch vorhandenen Resten des Fusionsproteins. Das Protein wird für die weitere Verwendung geeignet portioniert und nach Schockfrosten in N₂ bei –80°C gelagert.

2.7.3 Bestimmung der geeigneten Pufferbedingungen im Kreuzscreening-Verfahren

Um mit möglichst geringem Zeitaufwand die geeigneten Lösungsbedingungen für ein Proteinkonstrukt zu bestimmen, wurde ein Kreuzscreening-Verfahren angewendet (Bagby et al. 1997; Lepre & Moore 1998) . Dazu wurden 250 µl Aliquots des aufgereinigten Proteins unter noch denaturierenden Pufferbedingungen in Dialysekammern von geeigneter Größe (Abb. 2.2) oder Dialyseschläuche abgefüllt. Die Konzentration der Proteinlösung sollte etwa 0,5 bis 1 mg/ml betragen, um auch unvollständige Proteinpräzipitation erkennen zu können. Die Ausschlussgröße (MWCO) der verwendeten Membranen aus regenerierter Cellulose (Cellutrans RothTM) wurde mindestens 30% kleiner gewählt als die Masse des rückzufaltenden Konstrukts. In 50ml PP-Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss wurden mit Hilfe von Stocklösungen die zu testenden Puffer vorgelegt. Dabei wurden gleichzeitig zwei Parameter variiert, z.B. Pufferkonzentration und pH-Wert der Lösung oder pH-Wert und Salzkonzentration. Auch Salze und weitere Additive wie DTE oder EDTA wurden meist als Stocklösung zugegeben. Der pH-Wert der Lösungen wurde vor allem beim Einsatz von Additiven überprüft. Anschließend wurden die Dialysekapseln in die jeweilige Lösung

gegeben und bei 4 °C dialysiert. Nach 1 h erfolgte die erste Kontrolle auf mögliche Präzipitation, nach weiterer Dialyse über Nacht konnte der Test endgültig ausgewertet werden. Dazu wurden nach erneuter visueller Überprüfung die Kammern geöffnet und die enthaltene Proteinlösung 10 min bei 16000 g abzentrifugiert um das Präzipitat abzutrennen. Die verbliebene Proteinkonzentration im Überstand wurde mit der Bradford-Methode bestimmt und gibt Auskunft über die Eignung der eingesetzten Pufferlösung zur Rückfaltung des Proteins. Der pH-Wert der Pufferlösungen wurde erneut überprüft, um pH-Verschiebungen durch Additive usw. festzustellen und den genauen pH-Wert der Rückfaltung zu kennen.

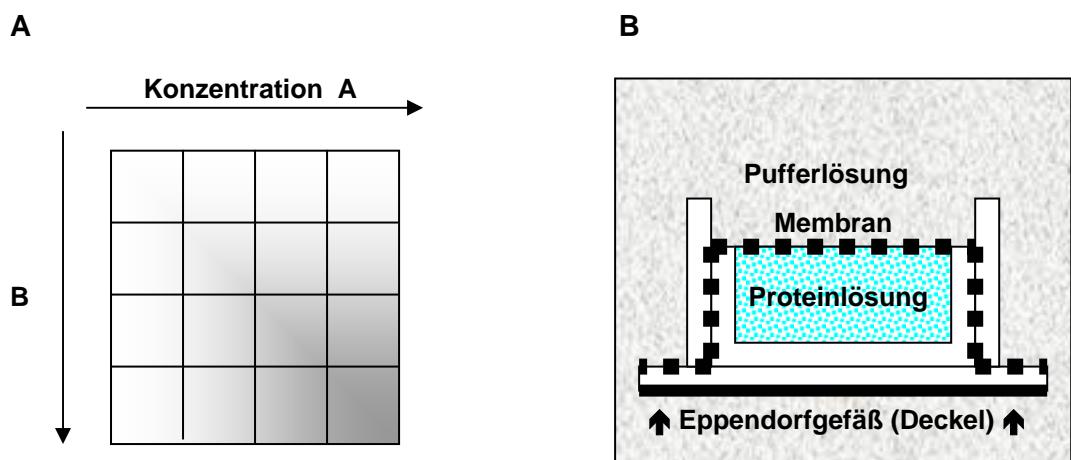


Abb. 2.2: (A) Typische Screening-Matrix und (B) selbstenwickelte Dialysekammer aus dem Deckel eines 2ml Eppendorf™-Reaktionsgefäßes

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, systematisch nach geeigneten Pufferbedingungen für ein Proteinkonstrukt zu suchen. Bei der Auswertung eines solchen Screens zeichnen sich oft bereits Muster ab, die eine Tendenz erkennen lassen, in welche Richtung weitergetestet werden sollte, selbst wenn noch kein vollständig lösliches Protein erhalten wurde. Als Ausgangspunkt wurden eventuell vorhandene Vorinformationen genutzt, z.B. die Lokalisation des Proteins *in vivo* und die in diesen Kompartiment zu erwartenden Lösungsbedingungen, der Gehalt an Cysteinen und die sonstige Aminosäurezusammensetzung. Brachten diese Ansätze keinen Erfolg, wurde innerhalb der für die geplanten Untersuchungen geeigneten Pufferbedingungen systematisch vorgegangen.

2.8 Weitere Methoden

2.8.1 D₂O Recycling Protokoll

Das folgende Protokoll zum Recycling von gebrauchtem D₂O NMM Kulturmedium wurde entwickelt um die Kosten der Expression perdeuterierter Proteine zu reduzieren.

Ausgangsmaterial:

D₂O Medium (NMM) z. T. aus ¹³C- und ¹⁵N-markierten Kulturen, filtriert durch Steritop Flaschenaufsatzzfilter und bis zur Aufbereitung tiefgefroren (-20°C).

Ammoniak-Entfernung:

Um Ammoniak möglichst vollständig zu entfernen, wird ein stark saurer Ionenaustauscher (Merck KGaA, Darmstadt) eingesetzt.

Aufbau:

Der Aufbau besteht im wesentlichen aus einer Standard-Destille mit Teilvakuum, das mittels einer Wasserstrahlpumpe und eines Kontrollventils auf ca. 300 mbar eingestellt ist. Beheizt wird durch ein thermostatisiertes Wasserbad auf ca. 80°C. Durch die Feinregulation der Badtemperatur kann der Verlauf der Destillation kontrolliert werden. Das Kühlwasser wird mittels eines Kryostaten umgewälzt und auf 10°C gehalten um die Ausbeute zu verbessern.

Durchführung:

Die Destillation erfolgt in 150ml Aliquots um ein Übergehen von ungereinigtem D₂O zu vermeiden. Übergangstemperatur beträgt ca. 70-75°C, abhängig vom Vakuum. Der Vorlagekolben und die anschließende Kühlflasche werden mit Hilfe von Eisbädern (Kühlakkus) gekühlt um eine erneute Verdunstung von D₂O zu vermeiden, das Teilvakuum verhindert eine Vermischung mit H₂O aus der Luft.

Nachreinigung:

Das destillierte D₂O wird in einer Blue Cap Flasche auf Aktivkohle-Granulat gegeben und über Nacht gerührt um mit übergehende organische Verbindungen zu binden. Der verbleibende Ammoniak (Geruch!) wird durch Entgasen mittels Wasserstrahlvakuum entfernt. Anschließend wird das D₂O mit einem Steritop-Filter (0,22µM) sterilfiltriert, dabei werden auch restliche Aktivkohlepertikel beseitigt.

Bestimmung von Reinheitsgrad bzw. Restwassergehalt:

Die Bestimmung erfolgt mittels eines 1D ¹H NMR Spektrums (Pulsprogramm ohne Wasserunterdrückung). Dabei wird die Halbwertsbreite des H₂O Signals mit dem einer Referenzprobe verglichen, die 96% D₂O und 4% H₂O enthält. Der Wassergehalt im aufbereiteten D₂O sollte 4% nicht überschreiten. Eventuell noch vorhandene organische

Verunreinigungen sind ebenfalls erkennbar, falls nötig, kann die Nachreinigung mit Aktivkohle wiederholt werden.

Verminderung des Restwassergehalts durch Ausfrieren:

Der Gefrierpunkt von D₂O liegt bei ca. 4°C. Daher kann Wasser, das erst bei 0°C gefriert, durch ausfrieren abgetrennt werden. Dazu werden etwa 400ml aufgereinigtes D₂O in einem 1L Erlenmeyerkolben im Tiefkühlraum bei –20°C heruntergekühlt und zu etwa zwei Dritteln des Volumens zu Eis gefrieren lassen. Der noch flüssige Überstand, in dem sich das Wasser angereichert hat, wird dekantiert und getrennt gesammelt, das D₂O-Eis aufgetaut. Dieser Vorgang wird zwei bis drei mal wiederholt, auch die vereinigten Überstände werden erneut ausgeforen.

So kann ca. 96%iges D₂O zurück gewonnen werden. Diese Konzentration ist zur Herstellung perdeuterierter rekombinanter Proteine in *E. coli* völlig ausreichend.

Ausbeute: Es können etwa 90% des eingesetzten D₂O zurück gewonnen werden.

2.9 NMR-Spektroskopische Methoden

2.9.1 Zusammensetzung der NMR-Proben

Alle NMR Proben enthalten neben dem jeweils angegebenen Puffer 8% D₂O und 0,1 mM DSS als internen Standard. Sollen die Proben längere Zeit gelagert oder für Langzeitmessungen eingesetzt werden, wird 0,01% Natriumazid (NaN₃) zugesetzt, um mikrobielle Kontamination zu verhindern. Auf Proteasehemmer-Fertigmischungen wurde verzichtet, da außer bei Verkeimung der Probe keinerlei Hinweise auf Proteaseaktivität gefunden wurden. Das typische Probenvolumen lag bei 490 µl. Alle Messungen wurden in 5 mm NMR-Röhrchen (Norell 502) durchgeführt. Je nach Ziel der Messung waren unterschiedliche Probenkonzentrationen erforderlich:

1D ¹ H Spektren (Pufferscreening, o.ä.)	ab ca. 0,1 mM Protein
Diffusionsmessungen	0,1 mM
Titrationsexperimente (beobachtetes Protein)	0,5 mM
3D Experimente für sequentielle Zuordnung	1-1,5 mM

2.9.2 Spektren und Pulspogramme

Alle Spektren wurden mit einem Bruker Avance 600 MHz NMR-Spektrometer mit CryoprobeTM TXI Probenkopf aufgenommen. Im folgenden sind die aufgenommenen NMR-

Spektren und die daraus erhaltenen Informationen zusammengestellt. Alle Pulsprogramme sind Standardprogramme, die von Bruker Biospin (Karlsruhe) entwickelt wurden.

Die für Puffer- und Rückfalttests sowie zur Kontrolle der Probenqualität vor und nach längeren 2D und 3D Experimenten eingesetzten 1D ^1H Spektren liefern durch die Protonensignale mit den für ihre chemische Umgebung typischen chemischen Verschiebungen eine Art Fingerabdruck des Proteins. Durch die auftretenden Überlagerungen können die Signale allerdings nicht zugeordnet werden. Ein Vergleich der charakteristischen Spektren ermöglicht es, Veränderungen der Probe z.B. während der mehrtägigen Aufnahme eines 3D Spektrums zu erkennen. Die Linienbreiten geben auch erste Informationen über den Oligomerisierungszustand des Proteins. Um das überlagernde Wassersignal zu vermindern wurde das Pulsprogramm *zggpw5* mit Wasserunterdrückung verwendet.

Bei 1D ^1H Diffusionsmessungen wird eine Reihe von 1D Spektren (*diffuledcwg*) aufgenommen, bei der ein zusätzlicher Feldgradient in bestimmten Inkrementen verstärkt wird. Die Abnahme geeigneter Referenzsignale, die durch die Diffusionsbewegung des Proteins im Gradientenfeld bedingt ist, ergibt über die Stokes-Einstein Beziehung Informationen über die Masse der Proteine oder Proteinoligomere in der Probe.

Durch die Markierung mit stabilen Isotopen können auch die sonst nicht magnetisch aktiven Kohlenstoff- und Stickstoffkerne beobachtet werden. Dazu werden ^{15}N - und, ^{13}C -markierte Proteinproben eingesetzt.

Die ^2H entkoppelten zweidimensionalen TROSY-HSQC Spektren (*trosyf3gpphs19*) erlauben die Beobachtung der Amidstickstoffatome der Proteinauptkette. Da je Aminosäure nur ein Signal erhalten wird, kann bei größeren Proteinen eine Überlagerung vermieden werden. Durch den Einsatz perdeuterierter Proteinproben wird eine Signalverstärkung erreicht, die die Linienverbreiterung bei großen Proteinen teilweise kompensieren kann. Da die H^{N} Protonen mit der wässrigen Lösung austauschen, können spezifisch diese N^{H} Stickstoffatome beobachtet werden.

Nach erfolgter sequentieller Zuordnung des Konstrukts reichen so 2D NMR Spektren mit relativ kurzen Aufnahmezeiten aus, um z.B. in einer Titrationsreihe spezifische Veränderungen einzelner Aminosäurereste, wie die Interaktion mit einem Liganden, zu beobachten. Die TROSY-Spektren (Pervushin 1997, Pervushin et al. 2000) zeigen bei größeren Proteinen eine deutliche Signalverstärkung so dass neben der Aufnahme gut aufgelöster 2D Experimente auch die Messung der für die sequentielle Zuordnung erforderlichen dreidimensionalen heteronuklearen NMR-Spektren mit nicht zu langen Aufnahmezeiten (ca. 72 h) möglich ist.

Im einzelnen wurden die folgenden Spektren eingesetzt:

TROSY HNCA (*trhncagp2h3d*): Zeigt die Kopplung von Amidstickstoffsignal und C^α Signalen der selben und der Vorgänger-Aminosäure, die C^α Signale zeigen zwar einen Intensitätsunterschied, da die Kopplung zum C^α der in der Sequenz N-terminal vorhergehenden Aminosäure über mehrere Bindungen verläuft, sind aber nicht sicher zu unterscheiden.

TROSY HN(CO)CA (*trhncocagp2h3d*): Zeigt im Gegensatz zum HNCA-Spektrum nur das C^α Signal des Vorgängers, das dadurch eindeutig identifizierbar ist.

TROSY HN(CO)CACB (*trhncocacbgp2h3d*): Durch zusätzliche Kopplung wird ein Signal des C^β Atoms der Vorgänger-Aminosäure erhalten. Es dient zur besseren Identifizierung der Aminosäuren bei der Zuordnung, da die chemische Verschiebung des C^β Signals durch die chemische Struktur der Seitenkette beeinflusst wird.

Über die N-H Ebene können die Informationen der 3D Spektren mit den 2D ¹H ¹⁵N Spektren verknüpft werden.

2.9.3 Titrationsexperimente

Zur Durchführung der Titrationsexperimente wird zunächst ein TROSY-HSQC Spektrum (*trosyf3gpphs19*) des ¹⁵N-markierten, perdeuterierten Proteins aufgenommen. Danach wird der fragliche Ligand (in unmarkierter Form) zugegeben und mit den gleichen Parametern ein weiteres TROSY-HSQC Spektrum aufgenommen. Die Veränderungen der Signalpositionen und Intensitäten können dann mit dem Auremol™ Softwarepaket ausgewertet werden. Anschließend kann die nächste Ligandenzugabe erfolgen, bis z.B. eine Sättigung erreicht wird. Bei Proteinen mit bekannter sequentieller Zuordnung können die Signalveränderungen den jeweiligen Sequenzpositionen zugeordnet werden.

2.10 Software und Datenbanken, wichtige Websites

Verwendete Datenbanken und Websites:

PDB (RCSB Protein Data Bank)	www.pdb.org/home/home.do
BMRB (Biological Magnetic Resonance Data Bank)	www.bmrb.wisc.edu.bmrb
EBI(European Bioinformatics Institute)	www.ebi.ac.uk.
The NCBI-Homepage	www.ncbi.nlm.nih.gov
Swissprot	www.expasy.org/sprot

<u>Alignments von Aminosäure-Sequenzen:</u>	ClustalW (EBI)
<u>Massen- und P_i-Berechnung der Proteinkonstrukte:</u>	ExPASy: pl_tool (Swissprot)
<u>Auswertungen:</u>	Microcal Origin 6.0 Microsoft Excel
<u>Steuer- und Auswertungssoftware ÄKTAfplc™</u>	Unicorn 5.10 (GE Healthcare)
<u>Bildbearbeitung:</u>	Adobe Photoshop Elements 2.0

NMR-Software und Homology Modeling:

CNS	(Brünger et al. 1998)
MolMol™	(Koradi, Billeter, & Wüthrich 1996)
TopSpin Version 1.3	(Bruker Biospin GmbH)
X-Win NMR	(Bruker Biospin GmbH)
Auremol™	(Bruker Biospin GmbH) (Gronwald & Kalbitzer 2003)

3. Ergebnisse

Für die Untersuchungen standen mehrere T1-Domänen-Konstrukte von Kv-Kanalproteinen zur Verfügung, die ein funktionelles Inaktivierungspeptid tragen. Diese Konstrukte wurden als Ergebnisse der Diplomarbeiten von Alexandra Auer (K_v1.4 T1K) (Auer 2002) und Christina Schreier (K_v3.4 165H und 153H) (Schreier 2002) übernommen. Im Rahmen der Diplomarbeiten wurden bereits Löslichkeit und Rückfaltbedingungen der Konstrukte untersucht und erste 1D und 2D NMR-Messungen vorgenommen. Diese erbrachten aber noch keine für strukturelle Untersuchungen geeigneten Ergebnisse. Die Konstrukte wurden daher im Bezug auf ihre Lösungsbedingungen und den Oligomerisierungszustand weiter charakterisiert um die Aufnahme gut aufgelöster NMR-Spektren zu ermöglichen, welche als Grundlage für die sequentielle Zuordnung und weitergehende NMR-Untersuchungen benötigt wurden. Des weiteren wurde mit der K_v1.3 T1-Domäne ein Konstrukt kloniert und charakterisiert, das im Gegensatz zu den anderen untersuchten K_v-Kanalproteinen kein funktionelles Inaktivierungspeptid besitzt.

3.1 Die K_v3.4 Konstrukte 165H und 153H

Alle K_v3.4 Konstrukte beginnen mit der ersten Aminosäure des K_v3.4 Kanalproteins, tragen also das vollständige Inaktivierungspeptid.

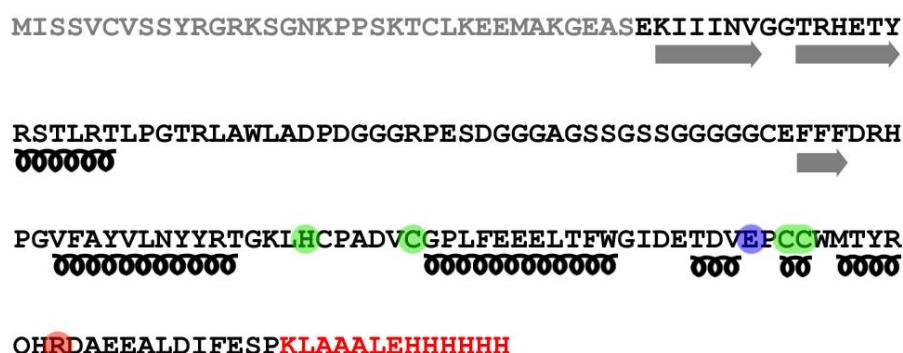


Abb. 3.1: Das K_v3.4 165H Konstrukt. Alignment mit Sekundärstrukturvorhersage beruhend auf der Struktur der zu über 90% homologen T1 Domäne von aK_v3.1 (PDB: 3KVT; Bixby&Choe 1999) mit farbiger Markierung der Konstruktänge der Kv3.4 Konstrukte und des Zn²⁺ Bindemotivs. Für die molaren Massen und Isoelektrischen Punkte (pl) der Konstrukte wurden berechnet: 165H 19,48 kDa, pl 5.91; 153H 18,16 kDa, pl 6,78; 142H 16,70 kDa, pl 6,29. Die Histidin- und Cysteinreste des Zinkbindemotivs sind grün markiert, die jeweils letzte Aminosäure der 153H und 142H Konstrukte sind rot bzw. blau markiert.

Als Ende der Konstrukte wurde zu Beginn der Untersuchungen der Beginn der S1 Helix gewählt, jedoch stellte sich während der Diplomarbeit heraus, dass die vielen hydrophoben Aminosäurereste des T1-S1 Linkers zu Aggregationsproblemen führten. Um lösliche Proteine zu erhalten, musste das Konstrukt daher C-terminal verkürzt werden. Das

so erhaltene Konstrukt 165H endet 12 AS nach dem Ende der letzten α -Helix der T1-Domäne, da der hydrophile und damit gut lösliche Teil des T1-S1 Linkers belassen wurde. Die Bezeichnung ist abgeleitet von der Länge des Konstrukts und dem C-terminal angehängten 6xHis-Tag. Das zu Beginn dieser Arbeit klonierte Konstrukt 153H ist weiter verkürzt bis zum Ende der C-terminalen α -Helix. Ein auf 142 AS verkürztes Konstrukt mit unvollständigem Zn^{2+} Bindemotiv zeigte erwartungsgemäß ebenfalls keinerlei Verbesserungen der Löslichkeit und stellte eine bereits stark verkürzte T1-Domäne dar. Dieses Konstrukt zeigte sich bereits bei ersten Rückfaltversuchen als problematisch. Von weiteren verkürzten Konstrukten wurde daher abgesehen. Der 6xHis-Tag liegt in den Konstrukten, die in den Vektor pET20b+ (Novagen) kloniert wurden, ohne eine Protease-Schnittstelle vor. Auf eine Umlklonierung in einen Vektor mit einem durch eine geeignete Schnittstelle entfernbaren 6xHis-Tag wurde jedoch verzichtet, da der polare 6xHistidin-Tag die Löslichkeit eher verbessert. Des Weiteren sollte durch den Zusatz von 5 mM EDTA eine Aggregation der 6x His-Tags über zweiwertige Ionen wie Mg^{2+} verhindert werden. Dies erwies sich jedoch später als kontraproduktiv für die Stabilität der NMR-Proben.

3.1.1 Expression und Aufreinigung des K_v3.4 165H Konstrukts

Die Expression des K_v3.4 165H Konstrukts erfolgte heterolog im *E. coli* Proteinexpressionsstamm Rosetta plysS (Novagen), um eine optimale Expression zu erreichen. Anschließend erfolgte die denaturierende Aufreinigung des von den Bakterien in Einschlusskörperchen, sogenannten Inclusion Bodies, deponierten Proteins unter 6 M Guanidiniumhydrochlorid (GdmHCl) über eine Ni-NTA (Qiagen) Matrix. Bei der folgenden, noch experimentellen Rückfaltung wurde durch Dialyse das denaturierende Agens soweit wie möglich entfernt und der Aufreinigungspuffer, ein gemischter Natriumphosphat- und Tris HCl Puffer mit weiteren Zusätzen (vgl. Methoden) und mit pH 4,5 relativ saurem pH-Wert durch den jeweils benötigten Puffer ersetzt. Da eine Rückfaltung zu einem ohne denaturierende Agentien löslichen und stabilen Protein zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich war, wurde die Dialyse stufenweise nur bis zu einer GdmHCl-Konzentration von 1M durchgeführt um das Konstrukt in Lösung zu halten. So war ein unproblematisches Arbeiten ohne plötzliche, bei geringfügigen Änderungen der Bedingungen auftretende Proteinaggregation möglich. Je nach vorgesehenem pH-Wert im folgenden Löslichkeitsscreening wurde Kaliumacetat-, Kaliumphosphat- oder Trispuffer eingesetzt. Natriumacetat und -phosphat hatten in Vorversuchen im Vergleich zu den Kaliumsalzen geringfügig schlechtere Ergebnisse gezeigt. Da das im Aufreinigungspuffer enthaltene β -Mercaptoethanol zur Ausbildung von Aggregaten in NMR-Proben führen kann, wurde es durch 10 mM DTE ersetzt.

3.1.2 Genaue Charakterisierung der Löslichkeit von Kv3.4 165H

Zur genaueren Bestimmung der Löslichkeit der Konstrukte der Kv3.4 T1 Domäne wurde ein Löslichkeitscreening durchgeführt. Dazu wurde die bereits in der meiner Diplomarbeit (Schreier 2002) beschriebene Screening-Methode eingesetzt, bei der jeweils 200 µl einer Proteinlösung unter einer Dialysierschlauch-Membran im Deckel eines abgeschnittenen 1,5 ml PP-Reaktionsgefäßes eingeschlossen und in den so entstandenen Dialysekapseln gegen die zu testende Pufferlösung dialysiert werden.

Ziel der Test war es, ausgehend von den Ergebnissen der ersten, noch während der Diplomarbeit durchgeführten Rückfaltungsexperimente, eine Pufferlösung zu finden, die eine gute Löslichkeit des Proteins auch ohne den Zusatz denaturierender Agentien ermöglichte. Zu diesem Zeitpunkt war bei pH-Werten zwischen 6,0 und 7,0 in 50 mM Kalium- oder Natriumphosphatpuffern noch ein Zusatz von mindestens 250 mM Guanidiniumhydrochlorid erforderlich, um das Protein stabil in Lösung zu halten. Schon allein die hohe Ionenstärke der Lösung führte bis dahin zu Problemen bei der Aufnahme der Spektren. Die geringe Auflösung und hohe Linienbreite der bis zu diesem Zeitpunkt aufgenommenen Spektren reichte für strukturelle NMR-Experimente bei weitem nicht aus, so dass eine erneute detaillierte Bestimmung der Lösungsbedingungen erforderlich war.

3.1.2.1 pH-Wert

Ausgehend von einer Proteinlösung, die durch 1M Guanidiniumhydrochlorid (GdmHCl) noch denaturiert war, wurden im Kreuzscreening-Verfahren sowohl der geeignete pH-Wert als auch die optimale Salzkonzentration für die Konstrukte 165H und 153H ermittelt. Dabei zeigte sich, dass sowohl im sauren als auch im basischen pH-Bereich eine Rückfaltung möglich war. Allerdings lagen die pH-Optima bei pH 9,0 in 20 mM Tris und pH 4,5 in 100 mM Kaliumacetat und damit weit entfernt von den angestrebten Bedingungen, die möglichst denen *in vivo* entsprechen sollten. Daher wurden nun die Grenzbedingungen für die Löslichkeit des Kontrakts nach erfolgter Rückfaltung ermittelt.

Für Kv3.4 165H konnten die folgenden Pufferbedingungen ermittelt werden: Im sauren Bereich konnte der pH-Wert ohne die Stabilität der Probe zu beeinträchtigen nicht wesentlich erhöht werden, pH 4,5 wurde daher beibehalten. Bei saureren Bedingungen blieb das Protein zwar in Lösung, aber hier können keine nativen Bedingungen mehr angenommen werden.

Nach einer Rückfaltung bei pH 9,0 konnte der pH-Wert auf pH 7,8 abgesenkt werden. Um die Stabilität der Probe sicherzustellen war für NMR-Messungen jedoch minimal pH 8,0 notwendig.

Ein vergleichbares Screening mit dem ^{153}H Konstrukt erbrachte im basischen Bereich deutlich schlechtere Ergebnisse. Erst bei pH-Werten über 9,0 konnte eine stabile Probe erhalten werden, im sauren Bereich war das Konstrukt bis pH 5,0 löslich. Aufgrund der für die NMR weniger geeigneten Pufferbedingungen wurde das ^{153}H Konstrukt daher nur noch als Referenzprotein verwendet.

3.1.2.2 Ionenstärke des Puffers und weitere Zusätze

Erste 1D Protonenspektren zeigten immer noch eine relativ hohe Linienbreite und schlechte Auflösung. Da durch die Entfernung des Guanidins die Ionenstärke des Puffers deutlich vermindert wurde und in der cytosolischen Umgebung der T1 Domäne eine Ionenstärke von etwa 150 mM zu erwarten ist, wurde ein Screening für die notwendige Salzkonzentration durchgeführt um die Löslichkeit des Kontrakts zu verbessern.

Im sauren Bereich konnte keine weitere Verbesserung erzielt werden, es blieb bei 100 mM Kaliumacetatpuffer. Im basischen Bereich konnte die Auflösung der Protonenspektren durch den Zusatz von NaCl verbessert werden. Im Screen zeigte der Bereich zwischen 100 und 200 mM NaCl eine deutliche Verbesserung. NMR-Testmessungen ergaben bei 150 mM NaCl und 20 mM Tris, pH 8,0 die besten Ergebnisse. Noch immer aber neigten die Proben zur Aggregation, bei Rückfaltversuchen konnte die Ausbeute ebenfalls nicht wesentlich verbessert werden. Sie lag wie zuvor bei etwa 20-30% des eingesetzten Proteins. Daher wurden die weiteren Zusätze im Puffer einer Überprüfung unterzogen. Das bisher in einer Konzentration von 10 mM schon bei der Rückfaltung zugesetzte Reduktionsmittel DTE erwies sich in erneuten Rückfaltversuchen als unverzichtbar, was bei einem Konstrukt, welches 7 Cysteinreste besitzt, zu erwarten ist. Ab einer Konzentration von 10 mM war keine weitere Verbesserung der Rückfaltausbeute und der Stabilität der Probe zu beobachten, so dass die bisherige DTE-Konzentration beibehalten wurde.

3.1.2.3 Einfluss von Zink auf die Löslichkeit und Rückfaltung

Zunehmend rückte jetzt der Zusatz von EDTA im Puffer in den Mittelpunkt des Interesses. Dieser Zusatz war ursprünglich gewählt worden, um eine Aggregation durch den nicht entfernabaren 6xHis-Tag zu verhindern und in den NMR-Proben Metalloproteasen zu inhibieren. Nach Weglassen von EDTA wurde aber keine Verschlechterung der Spektren oder der Haltbarkeit der Proben beobachtet. Die Funktion des Zn^{2+} Bindemotivs könnte jedoch durch EDTA beeinträchtigt werden, da dieses zweiwertige Ionen komplexiert. Die Tetramerisierung und Rückfaltung der Proteinkonstrukte könnte dadurch beeinflusst werden. Unter Berücksichtigung der Untersuchungen von Bixby und Choe an aK_v3.1 (Bixby 1999)

wurden Rückfaltexperimente mit Zusatz von ZnSO₄ und ohne EDTA durchgeführt. Dabei konnte die Ausbeute bei der Rückfaltung in Gegenwart von Zink deutlich verbessert werden, und die Stabilität des gelösten Proteins nahm zu. Eine Zinkkonzentration von 1 mM war dafür bereits ausreichend. Der stabilisierende Effekt von Zink auf das Kv 3.4 165H Konstrukt konnte auch in Acrylamid-Nativgelen gezeigt werden. Dazu wurden die in Anwesenheit von Zink rückgefalteten Proteinproben für 48h bei 4°C inkubiert, wobei bei einer Probe EDTA ad 20 mM zugesetzt wurde. Während die zinkhaltige Probe selbst bei Überladung eine scharfe Bande zeigte, war bei Zusatz von EDTA nur ein Schmier zu erkennen, was auf Aggregation des Proteins hinweist.

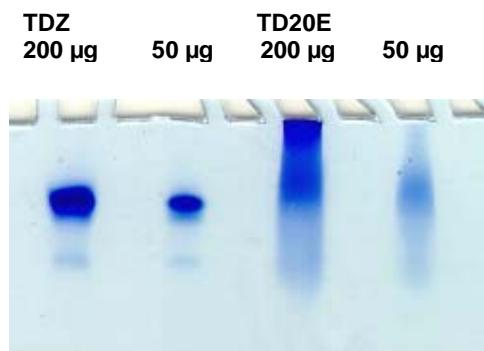


Abb. 3.2: Nativgel des Kv3.4 165H Konstrukts, links inkubiert (48 h) in 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM DTE und 1 mM ZnSO₄ (Bezeichnung TDZ); rechts mit Zusatz von 20 mM EDTA (Bezeichnung TD20E), aufgetragen wurden jeweils 200 und 50 µg Protein. Auf einen Standard wurde verzichtet, da im denaturierenden SDS-PAGE nur eine Proteinbande in der erwarteten Größe vorlag und hier lediglich der Aggregationszustand untersucht werden sollte.

3.1.3 Optimierung der Rückfaltung des 165H Konstrukts

Aufgrund der Ergebnisse des Pufferscreenings und weiterer Beobachtungen während der Rückfaltexperimente konnte die Rückfaltung des 165H Konstrukts optimiert werden. Dazu waren einige Änderungen des Rückfaltprotokolls erforderlich. Zunächst wurden die Rückfaltungsdialysen aufgrund der Notwendigkeit des Einsatzes von DTE als Reduktionsmittel in luftdicht verschließbaren Behältnissen wie z.B. Bluecap-Flaschen mit Schraubverschluss durchgeführt und die Pufferlösungen vor der Zugabe des DTE entgast. Da bei Guanidinkonzentrationen über 2,5 M bei keinem der Versuche eine Präzipitation von Protein beobachtet wurde, konnte die Guanidinkonzentration im Rückfaltpuffer, der zur Dialyse im Austausch gegen den Aufreinigungspuffer des Ni-NTA-Systems verwendet wurde, auf 3 M abgesenkt werden, ohne den Erfolg der Rückfaltung zu beeinträchtigen.

Je nach dem, ob im sauren oder basischen Bereich zurückgefaltet wurde, wurde KDZ Puffer pH 4,5 (100 mM Kaliumacetat, 10 mM DTE und 1 mM ZnSO₄) oder TDZ Puffer pH 9,0 (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM DTE und 1 mM ZnSO₄) verwendet. Die Konzentration der eingesetzten Proteinlösung betrug 1 mg/ml, also etwa 55 µM. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die GdmHCl-Konzentration bei jedem Pufferwechsel (nach 3 h oder ÜN) abgesenkt

bis schließlich gegen eine guanidinfreie Lösung dialysiert wurde. Eine schnellere Entfernung des denaturierenden Agens führte zu verstärkter Proteinpräzipitation. Nach Abschluss der Rückfaltung wurde das sehr feine Präzipitat 30 min bei 35000 g abzentrifugiert und das Protein durch Ultrafiltration aufkonzentriert.

Da in diesem Verfahren bei größeren Rückfaltungen mit 1 L und mehr Puffervolumen (bei etwa 100 mg eingesetztem Protein) relativ große Mengen von GdmHCl und DTE verbraucht wurden, was zu erheblichen Kosten führte, wurde nach einem wirtschaftlicheren Verfahren für den Rückfaltprozess gesucht. Da die Entfernung des GdmHCl langsam erfolgen musste, wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem nach erfolgtem Pufferaustausch ausgehend von 3 M GdmHCl durch langsamen Zufluss guanidinfreier Pufferlösung der GdmHCl-Gehalt der Lösung kontinuierlich verringert wurde. Ein fast vollständiger Luftabschluss wurde dadurch erreicht, dass der Prozess in einem zylindrischen Gefäß mit schwimmfähigem Deckel durchgeführt wurde. Die Zuführung der Pufferlösung erfolgte in Bodennähe, um eine gute Durchmischung der Lösungen mit unterschiedlicher Dichte zu ermöglichen.

Neben der Einsparung von mehr als 50% des Guanidins und etwa 30% der anderen Pufferbestandteile, ergab sich durch diese kontinuierliche Dialyse z. B. über Nacht eine erhebliche Zeitersparnis und damit auch eine Verminderung der Oxidation des Proteins sowie weniger Aggregation durch Disulfidbrücken. Die Ausbeute einer solchen Rückfaltung lag nun bei 60-70%. Damit war nun auch die Herstellung von ¹⁵N-markierten Proteinproben des 165H Konstrukts für weitergehende NMR-Untersuchungen möglich. Die Expression des Konstrukts war bereits während der Diplomarbeit optimiert worden.

3.1.3.1 Abschließende Aufreinigung des Zielproteins durch Größenausschlusschromatographie

Nach dem Aufkonzentrieren neigte das 165H Konstrukt sowohl bei pH 4,5 als auch bei pH 9,0 vor allem durch die bei diesem Arbeitsschritt kaum vermeidbare Oxidation erneut zur Aggregation. Daher wurde zunächst erneut abzentrifugiert, eine weitere Verbesserung der 1D Protonenspektren konnte aber erst durch Größenausschlusschromatographie erreicht werden. Mit Hilfe einer Superdex 75 16/60 Säule (GE Healthcare) konnten die Aggregate, die sich im Ausschlussvolumen befanden, sowie geringfügige Rückstände von Pufferbestandteilen wie GdmHCl vom stabilen rückgefalteten Protein abgetrennt werden. Im Fall einer basischen Rückfaltung konnte so auch die Absenkung des pH-Wertes durch Umpuffern auf der Säule erreicht werden.

3.1.4 NMR-Spektren zur Bewertung der Pufferbedingungen

Im Verlauf des Pufferscreenings wurden 1D ^1H NMR Spektren aufgenommen und mit den vor dem Screening aufgenommenen Spektren verglichen. Dabei konnte eine Verbesserung der Auflösung vor allem im Bereich der H^{N} -Protonensignale ($> 6,5$ ppm), festgestellt werden. In Abb. 3.3 ist der Bereich der H^{N} -Protonensignale im 1D Spektrum dargestellt. Zum Zeitpunkt dieser Messungen mit 165H lagen noch keine weiteren Spektren von T1 Domänen mit bekanntem Oliomerisierungszustand vor. Das als Vergleich gezeigte Spektrum des tetrameren K_v1.4 T1K Konstrukts (12,1 / 48,4 kDa) wurde erst deutlich später aufgenommen. Zum Zeitpunkt der Aufnahme der Spektren dienten Protonenspektren anderer etwa gleich großer Proteinkonstrukte als Vergleich.

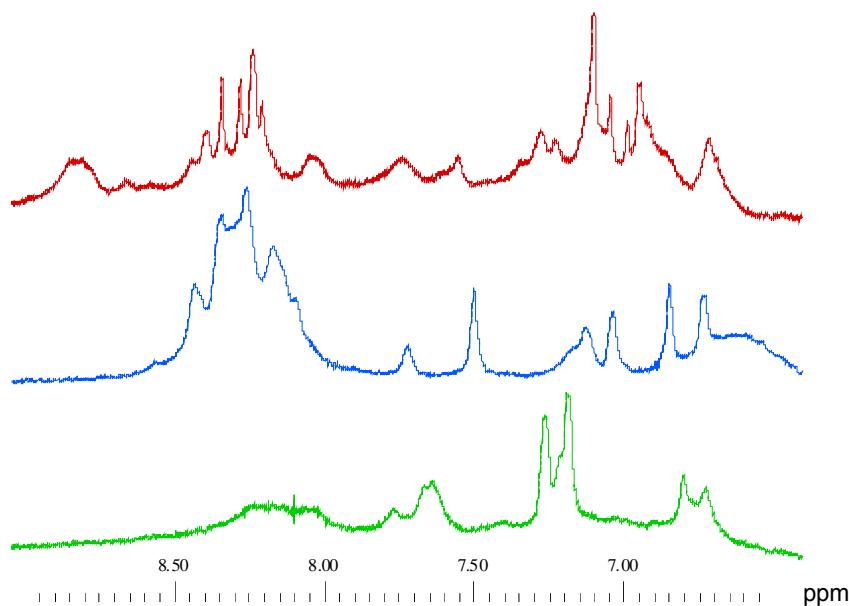


Abb. 3.3: NH-Bereich der 1D ^1H Spektren des K_v3.4 165H Konstrukts Grün: TDZ Puffer pH 8,0; blau: KDZ Puffer pH 4,5 beides jeweils 1 mM Protein, *Pulsprogramm p3919gp* (Bruker Biospin GmbH), 283 K; rot (zum Vergleich) K_v1.4 T1K Tetramer 150 mM Kaliumphosphat pH 6,5.

Die abgebildeten Spektren zeigen immer noch vergleichsweise breite Linien im H^{N} -Bereich und im Bereich jenseits des Wassersignals, in dem sich die Signale fast aller übrigen Protonen befinden. Hochfeldverschobene Signale, die von Methylprotonen im hydrophoben Core von Proteinen herrühren waren meist nicht erkennbar. Lediglich einzelne in KDZ Puffer aufgenommene Spektren zeigten vergleichsweise schwache und stark verbreiterte Signale in diesem Bereich. Die Protonensignale der Pufferbestandteile wie DTE und das DSS-Signal waren jedoch schmal. Das bei pH 4,5 aufgenommenen Spektrum zeigt mehr Signale im abgebildeten Bereich als das bei pH 8 aufgenommene, da bei basischen pH-Werten durch Deprotonierung Signale verloren gehen. Das im Sauren aufgenommene Spektrum scheint auch etwas besser aufgelöst als das mit basischem TDZ Puffer. In diesem Spektrum fehlen

nicht nur Signale, die noch vorhandenen sind zusätzlich verbreitert. Insgesamt ist auffällig, dass die Gesamtzahl der Signale für ein Protein mit fast 20 kDa molarer Masse relativ gering ist. Auch die Signale des KDZ-Spektrums sind noch verhältnismäßig breit, so dass das Vorliegen von Oligomeren zu vermuten ist.

In ebenfalls aufgenommenen 2D Protonenspektren (NOESY und TOCSY) in KDZ Puffer, konnten die Signale des Inaktivierungspeptids aufgrund der vorliegenden Peaklisten der Strukturbestimmung von Antz und Kalbitzer (Antz & Kalbitzer 1997), identifiziert werden. Diese Messungen waren ebenfalls bei pH 4,5 aufgenommen worden und wiesen daher vergleichbare chemische Verschiebungen auf. Da das Inaktivierungspeptid eine stabile Faltung aufweist, die hier somit nachweisbar war, konnte eine unkontrollierte Aggregation nicht- oder fehlgefalteter Proteine ausgeschlossen werden. Immer noch unklar blieb jedoch der tatsächliche Oligomerisierungszustand des 165H Konstrukts bei den jeweiligen pH Werten. Dieser schien beim KDZ Puffer höher zu sein als im TDZ Puffer. Dafür sprach auch, dass diese Proben erstaunlich zähflüssig waren und bei Proteinkonzentrationen über 10 mg/ml nach der Zentrifugation ein gelartiges, durchsichtiges Pellet aufwiesen, welches sich durch die Zugabe von etwas Puffer jedoch mühelos resuspendieren ließ und eine weitere Aggregation nicht begünstigte. Makroskopisch waren die KDZ-Proben eher stabiler als die der TDZ-Rückfaltung.

Eine Tetramerisierung des 165H Konstrukts war aufgrund der Funktion der im Konstrukt enthaltenen T1-Domäne anzunehmen. Daher wurden später analytische Gelfiltrationsexperimente durchgeführt, um weitere Informationen zu erhalten und zu überprüfen, ob bestimmte Oligomere oder Mikroaggregate eventuell durch einen weiteren Reinigungsschritt entfernt werden konnten.

3.1.5 TROSY HSQC-Spektren des ^{15}N markierten 165H Konstrukts

Um feststellen zu können, ob die erreichte Auflösung der Spektren für die Aufnahme der für eine sequentielle Zuordnung eines Proteins dieser Größe notwendigen zwei- und dreidimensionalen heteronuklearen NMR-Spektren ausreichte, war zunächst die Aufnahme eines 2D TROSY-HSQC Spektrums erforderlich für das eine ^{15}N markierte Proteinprobe benötigt wurde. Das 165H Konstrukt war mit 19,5 kDa so gross, dass der Versuch einer Zuordnung ohne die Verwendung isotopenmarkierter Proben selbst unter idealen Bedingungen nicht sinnvoll war.

Daher wurde das 165H Konstrukt nun zunächst ^{15}N markiert. Um eine Anreicherung von ^{15}N im Protein zu erreichen, wurde dieses in New Minimal Medium (NMM) mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ als einziger Stickstoffquelle exprimiert, aufgereinigt und nach dem neu entwickelten Protokoll

sowohl unter sauren als auch unter basischen Bedingungen zurückgefaltet. Mit dem ^{15}N markierten 165H Konstrukt wurde dann ein 2D TROSY-HSQC Spektrum aufgenommen.

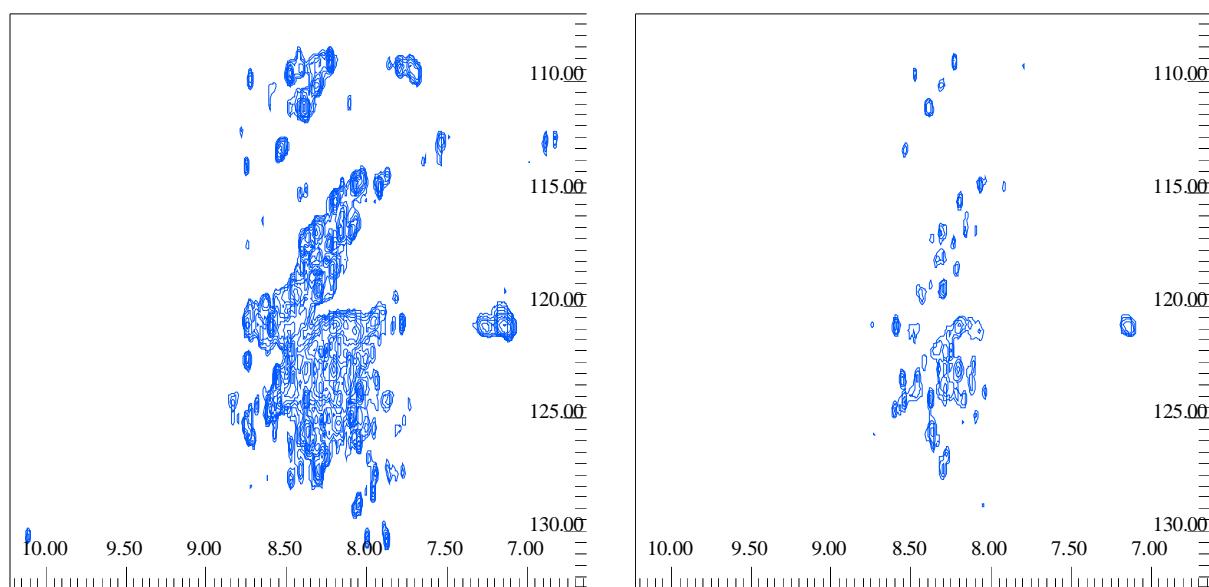


Abb. 3.4: TROSY HSQC-Spektren des 165H Konstrukts in KDZ Puffer pH 4,5 (alle Werte ppm ^1H horizontal ^{15}N vertikal) Die Aufnahme der Spektren erfolgte im 600 MHz Spektrometer mit Cryoprobenkopf bei 283 K. Probenkonzentration 1 mM. Die linke Abbildung zeigt alle vorhandenen Signale, rechts sind nur die stärksten, wenig verbreiterten Signale dargestellt.

Die TROSY Spektren zeigten auf den ersten Blick erwartungsgemäß eine relativ geringe Auflösung, wobei das im sauren KDZ-Puffer aufgenommene Spektrum (Abb. 3.4) aufgrund stärkerer Protonierung mehr und deutlichere Signale aufweist. Die Dispersion der Spektren war eher gering, dieser Eindruck könnte jedoch auch dadurch hervorgerufen werden, dass verbreiterte Signale vom relativ starken Rauschen des Spektrums überlagert werden.

Bei genauerer Betrachtung des KDZ 165H Spektrums zeigte sich jedoch, dass neben den fast immer vorhandenen typischen Arginin-Seitenkettenignalen zwei Gruppen von Signalen vorlagen. Die erste und auffälligste Gruppe von Signalen war verbreitert und relativ flach, die zweite Gruppe von Peaks war schärfer und besser aufgelöst, mit allerdings geringerer Dispersion. Diese Peaks könnten daher röhren, dass der Polyhistidin-Tag und der 12AS Rest des T1-S1 Linkers sowie das Inaktivierungspeptid relativ frei beweglich sind. Peakposition und Anzahl der scharfen Peaks stehen mit dieser Annahme in Einklang. Die Linienverbreiterung der anderen Peaks könnte durch die große molare Masse eines putativen Tetramers von 78 kDa und die damit verlangsamte Diffusion eines solchen Komplexes hervorgerufen werden.

Weiterhin auffällig war noch das Tryptophan-Signal, dass über 10 ppm hinausgeht und gut aufgelöst ist. Alle drei Tryptophane des Konstrukts liegen innerhalb der T1 Domäne. Damit ergibt sich ein weiterer Hinweis auf eine zumindest teilweise stabile Faltung des Konstrukts.

Da aber noch immer keine definitive Aussage über den Oligomerisierungszustand des 165H Konstrukts gemacht werden konnte, mussten weitere Analyseverfahren herangezogen werden, um die Eigenschaften des Konstrukts besser zu charakterisieren.

3.1.6 Analytische Gelfiltration: Nachweis der Tetramerisierung

Für die analytische Gelfiltration wurde eine in der Zwischenzeit beschaffte, neue Superdex 200 16/60 Säule (GE Healthcare) verwendet. Diese Säule erlaubt aufgrund ihrer höheren Ausschlußgröße von 200 kDa eine bessere Auflösung im Bereich möglicher Tetramere und weiterer, höherer Aggregate und wurde in der Folgezeit auch für die Proteinpräparation verwendet. Da eine selbst zusammengestellte und damit maßgeschneiderte Mischung von gut löslichen, monomeren und kompakt gefalteten Referenzproteinen unter gleichen Pufferbedingungen vermessen wurde, stand nun ein Standard zur Abschätzung der Größe bzw. der molaren Masse der Proteine zur Verfügung. Die Ergebnisse der zuvor durchgeföhrten präparativen Gelfiltrationen ließen wie schon die NMR-Spektren bereits vermuten, dass neben den erwarteten Tetrameren möglicherweise auch höhere Multimere des 165H Konstrukts vorlagen, die die Masse eines Tetramers von ca. 78 kDa überschritten.

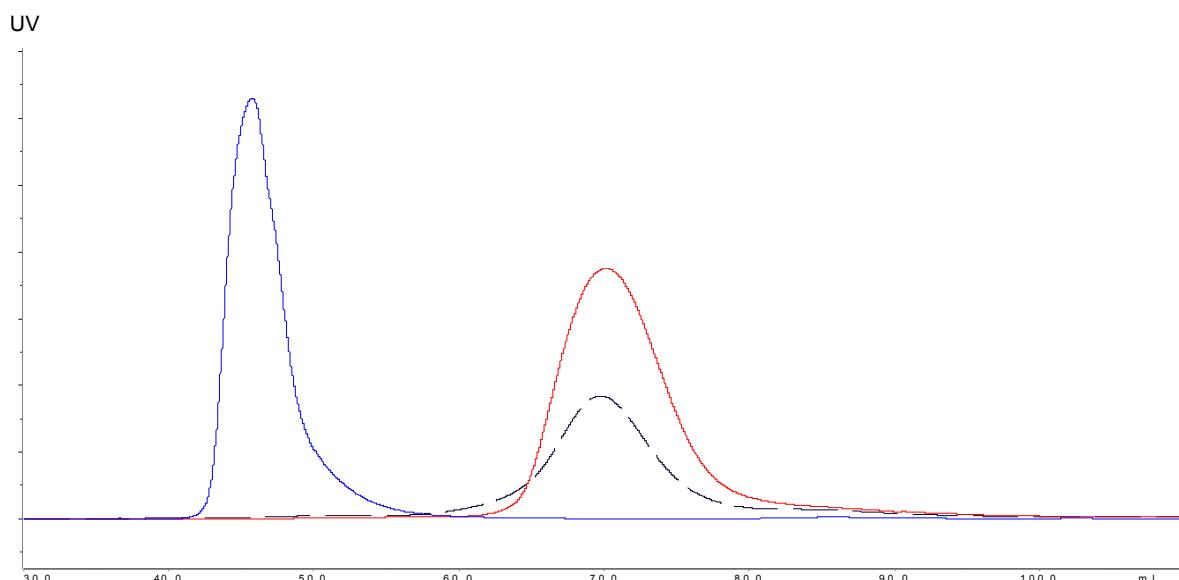


Abb. 3.5: Vergleich verschiedener präparativer Gelfiltrationsläufe des 165H Konstrukts. Neben dem KHZ Puffer pH 4,5 (blau) und TDZ NaCl Puffer pH 9,0 (schwarz) wurde auch eine Rückfaltung in Kaliumphosphatpuffer (150 mM) pH 9,0 durchgeführt (vgl. K_v1.4 T1K). Die UV-Absorption ist in relativen Einheiten dargestellt.

Die Gelfiltration wurde jeweils mit dem der NMR-Probe entsprechenden Puffer als Laufpuffer durchgeföhrt, da die Superdex Gelmatrix unempfindlich gegen moderate Änderungen von pH-Wert und Salinität ist, was auch in Vorversuchen bestätigt werden konnte. So konnte der Oligomerisierungszustand der Probe unter den gleichen Bedingungen wie bei der Aufnahme

der Spektren beobachtet werden. Zunächst wurden die präparativen Gelfiltrationsläufe unter den verschiedenen Pufferbedingungen mit dem neu erstellten Standard verglichen um eine Orientierung zu erhalten. In den Vergleich mit einbezogen wurde auch eine experimentelle Präparation des 165H Konstrukts bei pH 9 mit 150 mM Kaliumphosphatpuffer (KP_i) und 10 mM DTE. Aufgrund der hohen Konzentration des Puffers war der pH-Wert auch außerhalb des Pufferbereichs des Kaliumphosphats ausreichend stabil.

Es stellte sich heraus, dass das Konstrukt offenbar unter allen getesteten Pufferbedingungen in nur einem Oligomerisierungszustand vorlagen, da jeweils nur ein Peak beobachtet wurde. Ein Vergleich mit dem Standard (Abb. 3.6) zeigt, dass das Protein im TDZ Puffer deutlich über 150 kDa groß erscheint, also mindestens als Oktamer vorliegt. Die apparente Masse des Konstrukts in beiden Puffern mit pH 9,0 liegt bei etwa 80 kDa was eine Tetramerisierung vermuten lässt.

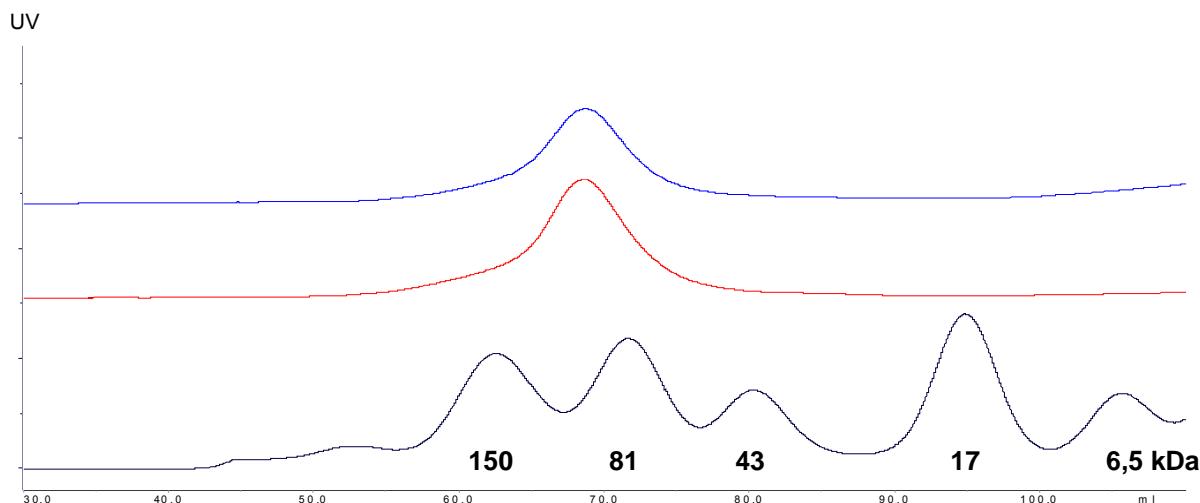


Abb 3.6: Analytische Gelfiltrationsläufe des 165H Konstrukts in TDZ-Puffer pH 9,0 (blau) und pH 8,0 (rot) im Vergleich mit dem Standard (schwarz). Die genaue Zusammensetzung des Standards ist unter 2.1.5 „Proteinstandards“ dargestellt. Hier sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die molaren Massen den jeweiligen Peaks zugeordnet. Die UV Absorption ist in relativen Einheiten angegeben.

In einer neuen Testreihe wurde nun ermittelt, ob eine Absenkung des pH-Werts auf 8,0, wie für die NMR eingesetzt, zu einer Veränderung des Oligomerisierungszustands führt. Hier konnte nachgewiesen werden, dass bei pH 8,0 trotz der Nähe zum Aggregationswert von pH 7,5 noch ein stabiles Tetramer vorliegt, da in der Gelfiltration keine Veränderung nachgewiesen werden konnte.

Da die NMR-Messungen mit dem Konstrukt in basischer Lösung kaum Erfolg versprachen wurde versucht, die Bildung von höheren Oligomeren in sauren Proben zu unterbinden. Dabei wurde auch nochmals der Einfluss von EDTA untersucht. Bei für eine NMR-Probe sehr hohen Konzentrationen von EDTA ab 50 mM konnte ein Tetramer des 165H Konstrukts

dargestellt werden, welches jedoch mit den immer noch vorhandenen Aggregaten im Gleichgewicht stand, und in der erforderlichen Konzentration nicht stabil war.

Auch Experimente mit Detergentien und denaturierenden Agenzien zur Darstellung eines Monomers waren nur bedingt erfolgreich, da nur bei vollständiger Denaturierung mit 6 M GdmHCl ein (vermutlich ungefaltetes) Monomer nachgewiesen werden konnte.

3.1.7 Nachweis der Multimere über Diffusionsmessung

Die K_v3.4 165H Konstrukte wurden wie auch das K_v1.4 T1K Konstrukt in NMR-Diffusionsmessungen vermessen um den Oligomerisierungszustand zu bestimmen. Es ergab sich jedoch kein klares Bild: Auch hier erschien das 165H Konstrukt im KDZ Puffer deutlich größer als 80 kDa, bei stärkeren Gradienten waren die Messungen aber aufgrund der stark verrauschten und nur noch sehr kleinen Restsignale kaum auswertbar. Die Messreihen blieben dadurch unvollständig, eine sinnvolle Auswertung war nicht möglich. Das 153H Konstrukt wurde ebenfalls vermessen, die Ergebnisse weisen auf eine noch stärkere Neigung zur Aggregation hin.

3.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der K_v3.4 Konstrukte

Die K_v3.4 Konstrukte erwiesen sich für die Herstellung einer NMR-Probe als problematisch, da die verschiedenen Konstrukte insgesamt eine eher schlechte Löslichkeit bzw. geringe Stabilität zeigten. Insbesondere die nur äußerst geringe Löslichkeit im Bereich zwischen pH 5 und 7,5, der der nativen Umgebung der intrazellulären Domänen des K_v3.4 Proteins *in vivo*, also dem Cytoplasma entsprechen würde, erschien problematisch. Beim insgesamt etwas besser löslichen 165H Konstrukt stellte sich zudem heraus, dass das Konstrukt im sauren Bereich stabile Oligomere bildet, die deutlich größer als ein Tetramer sind und allein durch ihre Masse von mehr als 150 kDa die Auflösung von mehrdimensionalen NMR-Spektren erheblich verringern. Diese Oligomerisierung konnte nicht vollständig vermieden werden, im besten Fall, bei Zusatz von 50 mM EDTA, stellte sich ein Gleichgewicht zwischen Tetramer und Oligomer in einer insgesamt instabilen Lösung ein. Eine solche Probe ist für strukturelle Studien wenig geeignet.

Im basischen Bereich konnte beim 165H Konstrukt ein stabiles Tetramer erhalten werden. Durch die aufgrund der teilweisen Deprotonierung relativ schwachen und durch die Tetramerisierung verbreiterten Signale konnten jedoch nur NMR-Spektren in relativ schlechter Auflösung erhalten werden, die für die sequentielle Zuordnung nicht ausreichten. Das 153H Konstrukt war bei pH-Werten unter pH 9,0 unlöslich und damit für NMR-Experimente im basischen Bereich aufgrund der Deprotonierung ungeeignet.

3.2 Das Kv1.4 Konstrukt Kv1.4 T1K

Das Konstrukt Kv1.4 T1K besteht aus der C-terminal leicht verkürzten T1 Domäne des shaker-ähnlichen Kaliumkanals Kv1.4. Neben Kv3.4 ist bei Kv1.4 ebenfalls ein funktionelles Inaktivierungspeptid (IP) nachgewiesen. Das IP ist jedoch nicht in dem von Alexandra Auer im Rahmen einer Diplomarbeit entwickelten Konstrukt enthalten, da es zusammen mit dem IP-T1 Linker 175 AS lang und damit mit der 88 AS T1-Domäne als mutmaßliches Tetramer zu groß für NMR-Untersuchungen ist. Aus der Arbeitsgruppe von Prof. Bernd Fakler in Freiburg, die die Struktur und Funktion des IP untersucht hat (Wissmann et al. 2003), stand jedoch ein gut charakterisiertes und stabiles Konstrukt des Kv1.4 IP zur Verfügung.

Die Verkürzung des Konstrukts um 6 AS im Vergleich zum ursprünglichen T1 Konstrukt ergab sich aus Verdauexperimenten mit Carboxypeptidase Y zur C-terminalen Verkürzung eines zunächst klonierten, längeren Konstrukts, welches zur Aggregation neigte (Auer 2002).



Abb. 3.7: Das Kv1.4 T1K Konstrukt besteht aus AS175-262 von Kv1.4. Das N-terminale Methionin und ein C-terminaler 6xHis-Tag mit Linker-Sequenz sind rot markiert. Die Gesamtlänge des Konstrukts beträgt 101AS, die T1 Domäne selbst ist 87 AS lang. Damit beträgt die molare Masse 12,06 kDa, der berechnete Isoelektrische Punkt liegt bei pH 7,02. Die Darstellung der Sekundärstruktur beruht auf einem Alignment mit der T1 Domäne von Kv1.2, deren Struktur im Jahr 2000 von Minor et al. veröffentlicht wurde (Minor, Berger; Cell 2000; PDB 1DSX). Aufgrund der mit 90% sehr hohen Sequenzidentität wurde hier der direkte Vergleich einer Sekundärstrukturvorhersage vorgezogen.

Für die Klonierung und Expression des Konstrukts wurde das der T1-Domäne vorangehende Cystein durch Methionin ersetzt, wodurch ein cysteinfreies Konstrukt entstand. Das Konstrukt wurde wie die Kv3.4 Konstrukte in den Vektor pET 20b+ (Novagen) kloniert. Und im *E. coli* RosettaTM pLysS Proteinexpressionsstamm (Novagen) heterolog exprimiert. Im folgenden wird auch die vereinfachte Schreibweise T1K verwendet.

Eine Umklonierung des Konstrukts in den Vektor pET 19b, der über einen N-terminalen, durch eine Enterokinase-Schnittstelle entfernbaren 6xHis-Tag verfügt, wurde in Erwägung gezogen. Nach sehr unbefriedigenden Ergebnissen des Enterokinase-Verdaus bei anderen Proteinkonstrukten (Kv1.4 C-Terminus) unter ähnlichen Pufferbedingungen wurden die bereits fertigen Konstrukte nicht weiter exprimiert. Da das Proteinkonstrukt bei dem für den Enterokinaseverdau erforderlichen pH-Wert nicht löslich war, erschien diese Methode wenig sinnvoll.

3.2.1 Optimierung der Pufferbedingungen

Das T1K Konstrukt wurde denaturierend aufgereinigt und zurückgefaltet (analog zu den K_v3.4 Konstrukten), die vor Beginn dieser Arbeit ermittelten Pufferbedingungen, Kaliumphosphatpuffer 50 mM pH 6,5 waren jedoch noch nicht so optimiert worden, dass die Auflösung von 2D und 3D NMR-Spektren für eine sequentielle Zuordnung ausreichte. Erste Vergleiche der bereits vorhandenen Spektren mit denen der K_v3.4 Konstrukte zeigten jedoch eine wesentlich bessere Auflösung bei K_v1.4 T1K. Aufgrund der Erfahrungen mit den K_v3.4 Konstrukten wurde neben der Optimierung der Pufferbedingungen auch eine möglichst rasche Charakterisierung des Konstrukts im Bezug auf seinen Oligomerisierungszustand angestrebt. Das T1K Konstrukt zeigte zwar eine aufgrund seiner geringeren Größe zu erwartende geringere Linienverbreiterung, war aber von einer optimalen Auflösung für ein Protein mit der molaren Masse 12,1 kDa noch deutlich entfernt.

Mit Hilfe der unter 3.1.2 und unter Materialien und Methoden beschriebenen Kreuzscreening-Experimente und der anschließenden Überprüfung von entsprechend rückgefaltetem Protein durch 1D ¹H NMR-Spektren konnte Kaliumphosphatpuffer in einer Konzentration von 150 mM bei pH 6,5 als bester Puffer identifiziert werden. Auch die Rückfaltausbeute verbesserte sich so auf 60-70%. Ein weiterer Zusatz von Salzen wie KCl oder NaCl erwies sich als nicht erforderlich. Durch das Fehlen von Cysteinen im Konstrukt war dieses gegen Oxidation unempfindlich, der Einsatz von DTE war damit nicht mehr notwendig. Ein Einfluss von DTE auf Löslichkeit oder Rückfaltausbeute des T1K Konstrukts konnte nicht festgestellt werden. Auch der Einfluss von EDTA auf die Auflösung der 1D ¹H Spektren wurde untersucht, da eine Aggregation des Proteins aufgrund der Anwesenheit der nicht abspaltbaren 6xHis-Tags nicht ausgeschlossen werden konnte. Es konnte jedoch, außer den zusätzlichen Signalen, die vom EDTA herrührten, keine Veränderung beobachtet werden. Auch ein Einfluss von EDTA auf die Stabilität der Probe war nicht erkennbar, also auch der Einsatz von EDTA als Proteasehemmer nicht notwendig.

Die gefundenen Bedingungen waren aufgrund des niedrigeren pH-Wertes und der damit höheren Protonierung der Amidstickstoffatome des Konstrukts besser zur Aufnahme von NMR-Spektren geeignet als die Pufferbedingungen von K_v3.4 165H. Die relativ niedrige Ionenstärke und der nicht notwendige Zusatz organischer Verbindungen waren günstig für die Aufnahme von NMR-Spektren. Dies zeigte sich auch in dem nach Abschluss des Pufferscreenings aufgenommenen 1D ¹H Spektrum.

Die Auflösung war verbessert, zusätzlich zu der hohen Anzahl gut aufgelöster Signale im H^N-Bereich, die zum Teil auf die jetzt protonierten Histidinreste des 6xHis-Tags zurückzuführen waren, waren deutlich hochfeldverschobene Signale von Methylprotonen erkennbar. Diese

weisen auf das Vorhandensein eines hydrophoben Cores und damit eine kompakte Faltung des Proteins hin (vgl. Abbildung 3.8).

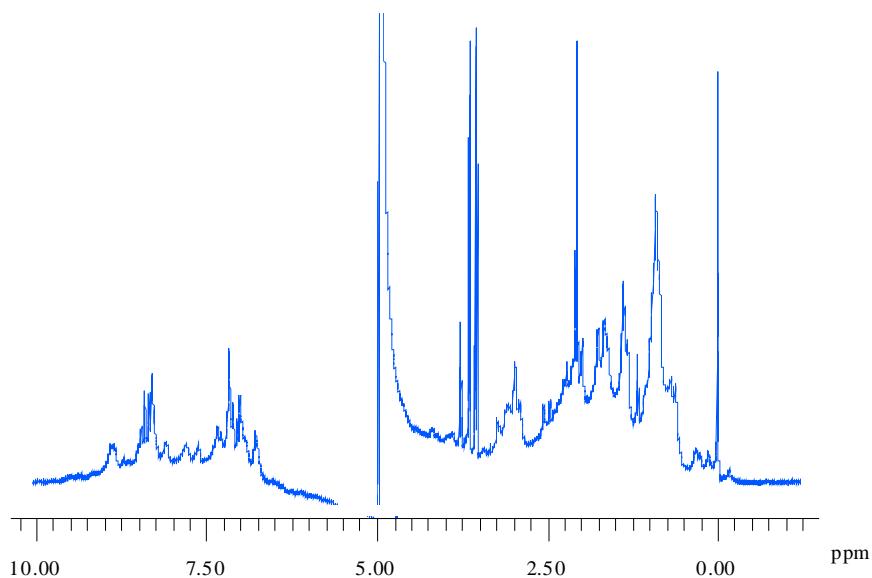


Abb. 3.8: Dargestellt ist ein unter Standardbedingungen aufgenommenes 1D ¹H NMR-Spektrum des K_v1.4 T1K Konstrukts. Deutlich erkennbar sind die hochfeldverschobenen Methylgruppensignale um das DSS Signal. Im Bereich der H^N-Protonensignale zeigt sich eine hohe Anzahl von Signalen. Neben einigen sehr scharfen Signalen die vermutlich auf den 6xHis-Tag zurückzuführen sind, sind relativ breite aber definierte Signale zu erkennen, die auf einen nicht monomeren Zustand des Konstrukts in Lösung hinweisen könnten.

Auch in 2D NOESY-Spektren waren Hinweise auf das Vorhandensein von α -helikalen und β -Faltblatt-Sekundärstrukturelementen zu finden. Allerdings waren die Linienbreiten für ein Protein mit der molaren Masse 12 kDa immer noch relativ hoch. Auch die Linienbreite eines TROSY-HSQC Spektrums, das mit einer ¹⁵N markierten Proteinprobe aufgenommen wurde, war noch relativ groß, wie für ein 48 kDa großes Tetramer zu erwarten. Eine Charakterisierung des Proteinkonstrukts in Bezug auf seinen Oligomerisierungszustand sollte nun Aufschluss bringen, ob ein stabiles Tetramer vorlag, das sich für NMRspektroskopische Untersuchungen eignete.

3.2.2 Untersuchung des Oligomerisierungszustands von K_v1.4 T1K

Zur Untersuchung des Oligomerisierungszustands der Probe standen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die Größenausschlusschromatographie oder Gelfiltration ermöglicht die Auftrennung eines möglichen Oligomerengemisches. Wie auch die NMR-Diffusionsmessung beruht die Analyse hier auf dem unterschiedlichen Radius der zu trennenden bzw. zu untersuchenden Moleküle. Die Diffusionsmessung erlaubte jedoch eine Beurteilung der Proteinprobe direkt im NMR-Gerät bei variabler Temperatur, d.h. den aktuellen Messbedingungen, während die Gelfiltration zur Schonung der Proteine bei 4 °C

durchgeführt wird. Hier ist anschließend eine weitere Charakterisierung der aufgetrennten Proteinfraktionen möglich.

3.2.2.1 Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration ermöglichte die Nutzung der bereits bei der Reinigung des Proteinkonstrukts gewonnenen Informationen sowie Möglichkeit der Untersuchung des Proteins unter nicht für die Aufnahme von NMR-Spektren geeigneten Bedingungen im Hochsalz-Bereich und unter denaturierenden Bedingungen.

Zunächst wurde der nach der Rückfaltung durchgeführte Gelfiltrationsschritt auf einer Superdex 200 Säule (GE Healthcare) mit den entsprechenden Gelfiltrationsschritten der K_v3.4 Konstrukte 153H und 165H verglichen und mit Hilfe der bereits erprobten Standardproteine die ungefähre Grösse des aufgereinigten Oligomers geschätzt. Dabei zeigte sich, dass außer den nach der Rückfaltung abzentrifugierten unlöslichen Aggregaten nur ein Oligomer des T1K Konstrukts vorlag. Dabei handelte es sich bei einer molaren Masse von etwa 43 kDa höchstwahrscheinlich um das erwartete Tetramer.

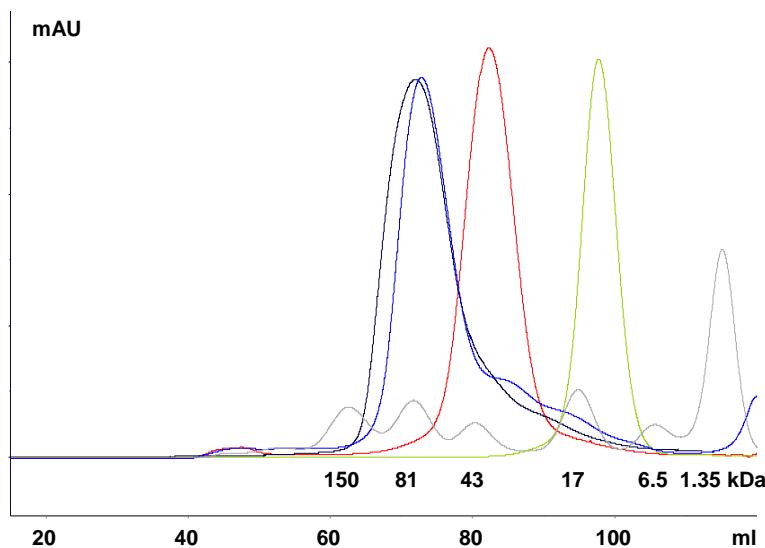


Abb. 3.9: Präparative Gelfiltrationsläufe mit einer Superdex 200 Gelmatrix (Amersham / GE Healthcare). In der Überlagerung sind die Größenverhältnisse der Konstrukte gut zu erkennen. Die Gelfiltrationen von T1K (12,1 kDa, rot), der als zusätzliche Refenz eingesetzten RNAse A (13,4 kDa, grün) und des Standards (grau) wurden in 150 mM K_p, pH 6,5 durchgeführt. Bei K_v3.4 165H (19,5 kDa, schwarz) und K_v3.4 153H (18,2 kDa, blau) wurde TDZ-Puffer pH 8,0 eingesetzt.

Der Vergleich mit RNAse A, die mit 13,4 kDa molarer Masse und relativ kompakter Struktur etwa einem Monomer entsprechen würde, und den mit etwa 80 kDa deutlich größeren Tetrameren der K_v3.4 Konstrukte bestätigt diese Vermutung.

Zusätzlich wurden analytische Gelfiltrationsläufe mit hohen Konzentrationen von, Guanidiniumhydrochlorid (GdmHCl) und Kaliumphosphat sowie unter sauren Bedingungen

bei pH 2,5 durchgeführt, um Informationen über die Vorgänge bei der Rückfaltung des Proteins und die Möglichkeiten zur Darstellung eines Monomers zu erhalten. Bei höheren Konzentrationen von GdmHCl (über 1,5 M) wurden neben dem in der guanidinfreien Referenzmessung beobachteten einzelnen Peak weitere Peaks beobachtet, die früher eluierten, und damit ein höhere apparette molekulare Masse besaßen. Dies war unter denaturierenden Bedingungen zunächst verwunderlich, da hier keine Bildung von höheren Aggregaten zu erwarten war. Erst unter Einbeziehung der Ergebnisse der CD-Spektroskopie konnten diese Beobachtungen zufriedenstellend erklärt werden. Vermutlich handelte es sich hier um denaturierte Proteine, deren hydrodynamischer Radius entsprechend erhöht ist, da in der CD-Spektroskopie der Verlust der Sekundärstruktur nachgewiesen werden konnte.

Auf den ersten Blick ebenso verwirrend waren die Ergebnisse bei hohen Konzentrationen des Kaliumphosphatpuffers. Die Experimente wurden durchgeführt, um herauszufinden, ob die hydrophile Interaktion der Bindungsflächen der T1-Domänen im Tetramer durch hohe Salzkonzentrationen gestört werden können und damit ein Monomer dargestellt werden kann. Kaliumphosphat wurde ausgewählt, da aus dem Pufferscreening bekannt war, dass das Chlorid-Anion die Löslichkeit des Konstrukts schon in Konzentrationen unter 200 mM verschlechtert und Aggregationen begünstigte. Natrium-Kationen hatten im Vergleich mit Kalium immer etwas ungünstigere Ergebnisse erbracht.

In der Gelfiltration konnte jedoch bis 600 mM Kaliumphosphat (KP_i) pH 6,5 keine Veränderung beobachtet werden, bei höheren Kaliumphosphat-Konzentrationen ergab sich eine graduelle Verschiebung des Peaks hin zu geringeren molaren Massen. Ab 850 mM KP_i konnte eine verstärkte Aggregatbildung und Proteinpräzipitation beobachtet werden. Die verschobenen Peaks entsprachen immer noch einer molaren Masse von etwa 20 kDa, waren also deutlich zu groß für ein Monomer des T1K Konstrukts. Auch hier half erst die Einbeziehung der Daten aus der CD-Spektroskopie bei der Interpretation weiter. Der Gehalt an Sekundärstrukturelementen war auch bei den hohen KP_i Konzentrationen nahezu unverändert. Es handelte sich hier vermutlich um einen Salting out Effekt, hervorgerufen durch die Konkurrenz von Pufferbestandteilen und Protein um die vorhandenen Wassermoleküle. Die Hydrathülle des Proteins wird kleiner, daher verringert sich die apparette Größe des Proteins. Der Aggregatpeak in den Gelfiltrationen ist nicht verschoben, die Eigenschaften der Gelmatrix waren also unverändert.

Im sauren Bereich mit 150 mM Kaliumacetatpuffer konnte ein Peak in der Größe eines Monomers dargestellt werden, dieser war allerdings Teil eines nicht auftrennabaren Oligomerengemisches, das darüber hinaus noch instabil und damit für die NMR völlig ungeeignet war.

Insgesamt konnte also als Ergebnis der Aufreinigung ein sehr stabiles Tetramer erhalten werden, das nur unter relativ extremen Pufferbedingungen zur Aggregation oder Bildung

eines Oligomerengemisches neigte. Die Darstellung eines Monomers war unter Bedingungen, die für die Aufnahme von hochauflösten NMR-Spektren geeignet waren, nicht möglich.

3.2.2.2 Stabilität der NMR-Probe

Das erhaltene T1K Tetramer wurde nun auf seine Stabilität hin getestet, um die zuverlässige Handhabung der NMR-Probe zu gewährleisten. Die Probe war in 150 mM KP_i pH 6,5 bei einer Monomer-Konzentration von bis zu 2 mM bis 30 °C (303 K) stabil und konnte auch ohne Qualitätsverlust oder Veränderungen in den zur Kontrolle aufgenommenen NMR-Spektren eingefroren und wieder aufgetaut werden. Proteasehemmer waren nicht notwendig, Proben, die über längere Zeit für Messungen eingesetzt werden sollten, wurden als Schutz gegen Verderb durch Mikroorganismen mit Natriumazid konserviert. Auch nach längerer Lagerung bei 4 °C war keine Aggregatbildung zu beobachten.

3.2.2.3 Diffusionsmessungen

Um den Oligomerisierungszustand der Probe während der Messung beurteilen zu können, wurden NMR-Diffusionsmessungen durchgeführt. Dazu mussten die Proben auf eine Protein-Monomerkonzentration von 0,1 mM verdünnt werden, da sonst durch die erhöhte Viskosität der Probe die Diffusion eingeschränkt wurde und daher Artefakte auftraten. Die mathematischen Auswertung basierend Diffusionsgleichung setzt eine globuläre Struktur des Proteins voraus. Da für Proteine nur in seltenen Ausnahmefällen eine globuläre Struktur angenommen werden kann und aufgrund der bereits gelösten Kristallstrukturen homologer T1-Domänen eher mit einem blüten- oder kleeblattförmigen Querschnitt des Tetramers zu rechnen war, wurden auch Vergleichsproteine vermessen. Das für den Gelfiltrationsstandard verwendete Ovalbumin war für diese Messung ungeeignet. Daher wurden RNase A (13,4 kDa) und Transferrin (81 kDa) verwendet. Als Referenz für eine nicht diffundierende Substanz diente quervernetztes Polyacrylamid, als schnell diffundierende Substanz wurde zusätzlich Vitamin B₁₂ (1,35 kDa) eingesetzt, das im Gegesatz zu etwa gleich schweren, meist ungefalteten Peptiden eine relativ kompakte Struktur besitzt.

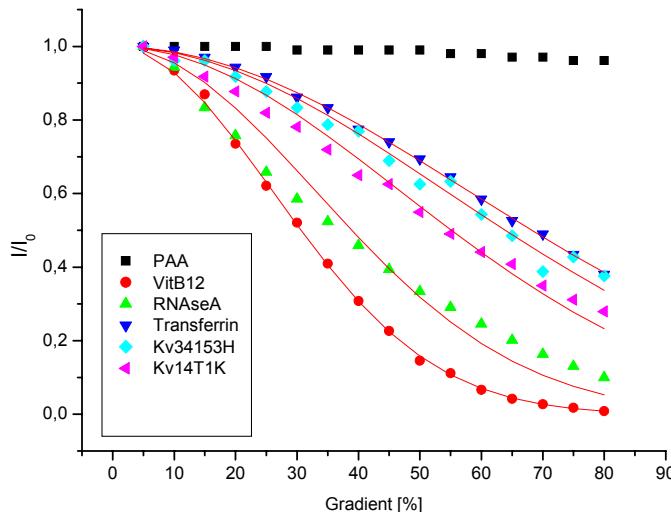


Abb. 3.10: Ergebnis der NMR-Diffusionsmessung der Kv1.4 T1K und Kv3.4 153H Konstrukte. Aufgetragen ist die normierte Intensität des jeweiligen Referenzsignals gegen den Gradientenwert. Die Daten wurden auf Basis der Stokes-Einstein Beziehung gefüttet (rote Linien). Der so bestimmte Diffusionskoeffizient ist direkt proportional zur molaren Masse der Proteine bzw. Proteinmultimere. Entsprechend der unterschiedlichen Massen der untersuchten Konstrukte und Referenzproteine ist ein unterschiedlich schneller Abfall der Intensität zu beobachten. Dargestellt sind neben dem T1K Konstrukt (12,1 kDa) und dem 153H Konstrukt (18,15 kDa) die Referenzsubstanzen RNAse A (13,4 kDa), Transferrin (81 kDa), Polyacrylamid und Vitamin B₁₂ (1,35 kDa).

Nach Umrechnung der erhaltenen Diffusionskoeffizienten zeigte sich, dass zwar qualitativ die erwartete Reihenfolge der Werte erreicht wurde, aber speziell bei den kleinen Referenzsubstanzen Vitamin B₁₂ und RNAse A deutlich zu hohe Koeffizienten bestimmt wurden. Daher kann diese Messreihe trotz mehrfacher Wiederholung nur qualitativ ausgewertet werden. Der unruhige Verlauf der Datenpunkte des 153H-Konstrukts weist auf eine fehlerbehaftete Messung hin (vgl. 3.1.7).

Das Ergebnis der Diffusionsmessung zeigt, dass die Diffusionsgeschwindigkeit des T1K Konstrukts deutlich geringer ist als die von RNAse A, also die molare Masse des Konstrukts ein Mehrfaches des Monomers sein muss. Gleichzeitig diffundiert das Konstrukt deutlich schneller als das 81 kDa große Transferrin. Artefakte, die auf ein Oligomerengemisch hindeuten würden nicht beobachtet. Das Ergebnis der Gelfiltrationsexperimente konnte somit bestätigt werden. Die Analyse des Kv3.4 Konstruktes konnte, vermutlich aufgrund von Aggregationen, nicht vollständig ausgewertet werden. Die ermittelten Werte lagen jedoch im Bereich des 81 kDa großen Transferrins, das Konstrukt lag also mindestens als Tetramer vor.

3.2.3 Vorbereitungen für das sequentielle Assignment von Kv1.4 T1K

Für ein sequentielles Assignment des tetrameren T1K Konstrukts, welches als Grundlage für die Durchführung der geplanten Interaktionsstudien benötigt wurde, waren dreidimensionale NMR-Spektren ¹⁵N- und ¹³C-markierter Proben erforderlich. Bei einer rechnerischen Masse des Konstrukts von 48,4 kDa ist ein Assignment nur mit 2D NMR-Spektren und ¹⁵N

Markierung, wie es normalerweise bei Proteinen unter 20 kDa molarer Masse angewandt wird, nicht möglich. Aufgrund der Linienvbreiterung durch die langsamere Diffusion des Tetramers war die Auflösung der 2D Spektren zu gering. Auch die Auflösung doppelt markierter Proben in 3D HNCA-Tripelresonanzspektren war durch Überlagerung der verbreiterten Signale noch zu gering. Das gleiche Problem war zuvor bereits in TROSY-HSQC Spektren aufgetreten, wo die Anzahl der erhaltenen Signale nur bei etwa 75 bis 80 lag, obwohl das Konstrukt 101 AS lang ist und jeweils ein Signal pro N-H Bindung der Amidstickstoffe der Hauptkette zu erwarten ist.

Zur Verbesserung der Auflösung der Spektren wurde eine Deuterierung des Proteinkonstrukts in Erwägung gezogen. Dabei wird das Wasser in der Expressionskultur durch D₂O ersetzt. Während der anschließenden wässrigen Aufreinigung werden die D^N Deuteronen wieder gegen Protonen ausgetauscht. Somit wird nach wie vor in der NMR-Messung ein Signal erhalten, solange über die H^N-Protonen eingestrahlt wird, der Hintergrund an CH-Protonensignalen ist jedoch deutlich vermindert.

Da die Durchführung einer solchen dreifach markierten Proteinexpression aufgrund der Kosten für die isotopenreinen Ausgangssubstanzen sehr teuer war, wurden zunächst alle die Ausbeute der Proteinexpression und -aufreinigung beeinflussenden Parameter überprüft und, wenn nicht bereits geschehen, optimiert.

3.2.3.1 Optimierung der Proteinexpression

Die Optimierung der Proteinexpression im Vollmedium (TB) war im Zuge der Proteinexpression für die bereits durchgeführten Experimente erfolgt. Auch die Adaptation an NMM Minimalmedium war bereits durchgeführt worden. Danach hatten sich eine Expression über Nacht bei 37 °C nach der Induktion mit 0,9 mM IPTG bei einer optischen Dichte der Kultur von 0,7 als optimal erwiesen. Beim Einsatz von D₂O statt H₂O zeigte sich jedoch ein deutlich verlangsamtes Wachstum der Kulturen, die Verdoppelungszeit einer Kultur im exponentiellen Wachstum stieg von ca. 60 auf 120 Minuten. Der Isotopeneffekt, der zuvor bei der ¹⁵N- und ¹³C-Markierung kaum zum tragen kam, zeigte sich hier deutlich, vermutlich aufgrund des wesentlich größeren relativen Unterschieds der Atommassen bzw. des Atomradius. Hierdurch sind alle enzymatischen Reaktionen, die unter Beteiligung von Wassermolekülen oder Protonen ablaufen, beeinträchtigt, d.h. verlangsamt.

Aufgrund bestehender Erfahrungen und des wesentlich verlangsamten Stoffwechsels der Bakterien in D₂O wurde von den oft beschriebenen Methoden (vgl. z.B. Baker 2006) in LB Medium angezogene Kulturen abzentrifugieren, zu waschen, im jeweiligen Markierungsmedium wieder aufzunehmen und nach kurzer Regenerationszeit zu induzieren abgesehen. Hierdurch würde der aerobe Stoffwechsel der Kultur gestört, was

erfahrungsgemäß den Stoffwechsel der Kultur verlangsamt. Stattdessen wurden die Kulturen im Verhältnis 1:10 bis 1:20 (je nach erreichter Zelldichte) aus möglichst dichten Vorkulturen in durch Schütteln im Kulturenschüttler sauerstoffgesättigtes und vorgewärmtes Medium überimpft. Nach meist nur einer weiteren Teilung der Bakterien wurde die Induktionszelldichte erreicht und so in noch kaum ausgelaugtem Medium induziert. Da eine denaturierende Reinigung vorgesehen war, wurde die Temperatur nicht abgesenkt. Zur Kompensierung des durch den Isotopeneffekt verlangsamten Stoffwechsels der Kultur wurde die Expressionszeit auf bis zu 24 Stunden verlängert.

Für dreifach markierte Proben (¹⁵N, ¹³C, ²D) musste die erforderliche Glucosekonzentration im Medium überprüft werden. Vorversuche hatten ergeben, dass der relativ geringe Glucosegehalt des Mediums von maximal 2 g/L limitierend für das Wachstum der Kulturen war. Bei einem für ¹⁵N und ¹³C Markierung optimierten Medium war dies durchaus sinnvoll, da ¹³C-Glucose als C-Quelle der teuerste Medienbestandteil war. Beim Einsatz von D₂O ist aber eine optimale Ausnutzung des Mediums am wirtschaftlichsten, da das Medienvolumen zum Kostenfaktor wird. Die verfügbare Stickstoffmenge erwies sich bei der eingesetzten Konzentration von 1 g/L ¹⁵N-Ammoniumchlorid als nicht limitierend. Die optimale Glucosekonzentration lag bei 4-6 g/L. Pro Liter Medium konnten so bis zu 40 mg dreifach markiertes T1K Protein erhalten werden.

3.2.3.2 Optimierung der Rückfaltungsausbeute des T1K Konstrukts

Das bei den K_v3.4 Konstrukten technisch optimierte Rückfaltverfahren war unter Anpassung der Pufferbedingungen bereits übernommen worden (vgl. 3.1.2. ff.). Erneut überprüft wurde jedoch die zur Rückfaltung eingesetzte Proteinkonzentration, um die immer noch beobachtete Präzipitation während der Rückfaltung zu vermindern. Es gelang so, bei einer Ausgangskonzentration des T1K Konstrukts von 0,5 mg/ml die Ausbeute auf etwa 80% zu steigern. Dieser Effekt wurde zum Teil jedoch durch höhere Verluste beim nun durch das größere Volumen zeitintensiveren Ultrafiltrationsschritt zunichte gemacht. Der Wechsel des Modells der eingesetzten Konzentratoren unter Beibehaltung der Ausschlussgröße 10 kDa von Centricon Plus-20 (Amicon Bioseparations, Ultracel PL Membran) auf Vivaspin 20 (Vivascience, PES Membran), der unter den gegebenen technischen Umständen ein schnelleres Aufkonzentrieren des rückgefalteten Proteinkonstrukts ermöglichte, konnte diese Verluste begrenzen. Nach dem folgenden Gelfiltrationsschritt konnte nun eine Gesamtausbeute von etwa 60% der ursprünglich für die Rückfaltung eingesetzten Proteinmenge sichergestellt werden.

3.2.3.3 Entwicklung eines Recyclingverfahrens für D₂O aus Kulturmedien

Die perdeuterierte Expression von Proteinen erfordert den Einsatz relativ großer Mengen D₂O, was einen nicht unerheblichen Kostenfaktor darstellt. Daher wurde eine Methode zur Aufbereitung des D₂O aus dem gebrauchten Kulturmedium entwickelt. Das hier in seinen wesentlichen Aspekten wiedergegebene Protokoll ist detailliert unter Methoden dargestellt. Zur Desinfektion und Präzipitation gelöster Proteine wurde das Medium mit konzentrierter HCl versetzt und nach erfolgter Präzipitation abfiltriert. Anschließend wurde der im Medium enthaltene Ammoniak mit einem Ionenaustauscher entfernt und nach Abtrennung des Ionenaustauscherharzes mit NaOH Pellets neutralisiert. So konnte das Übergehen von HCl-Gas in der folgenden Destillation verhindert werden. Das Destillat wurde, da noch flüchtige organische Verbindungen enthalten waren, nochmals über Aktivkohle gereinigt. Der Siedepunktsunterschied von H₂O und D₂O ist mit 2 °C zu gering für eine fraktionierte Destillation. Da D₂O jedoch schon bei + 4 °C gefriert, ist eine Trennung beider Flüssigkeiten durch Ausfrieren gut möglich. Der Restwassergehalt ist sehr einfach über 1D ¹H-Spektren durch Vergleich des Wasserpeaks mit Referenzproben bestimmbar. Das aufgereinigte D₂O war pH-neutral und hatte eine Konzentration von mindestens 96%. Der Gesamtverlust an D₂O während des Recyclingprozesses liegt bei 6-8%. In 1D ¹H-Spektren konnten nur noch geringe Spuren niedermolekularer organischer Verbindungen, vermutlich Alkohole, nachgewiesen werden. Das Wachstum von *E. coli* Kulturen wurde dadurch jedoch in keiner Weise beeinträchtigt. Bis zum Abschluss dieser Arbeit wurden bis zu sechs Recyclingzyklen mit einer Charge D₂O durchgeführt.

3.2.3.4 Herstellung dreifach isotopenmarkierter NMR-Proben des K_v1.4 T1K Konstrukts

Damit waren die Voraussetzungen für die Herstellung ¹⁵N- und ¹³C-markierter und teilweise deuterierter NMR-Proben gegeben. Zur Herstellung nahezu vollständig deuterierten Proteins wäre zusätzlich der Einsatz perdeuterierter Glucose erforderlich, was jedoch aufgrund der hohen Kosten zunächst zurückgestellt wurde.

Die Expression und Aufreinigung des K_v1.4 T1K Konstrukts erfolgte unter den in den Optimierungsversuchen ermittelten Bedingungen. Aus 2,2 L 3xNMM Medium konnten so 83 mg des Konstrukts erhalten werden. Trotz der unvermeidlichen Verluste bei Rückfaltung und Nachreinigung war diese Menge ausreichend für 4 NMR-Proben von jeweils 450 µl Volumen mit einer Proteinkonzentration von 1,1 bis 1,4 mM. Das nicht sofort benötigte Material wurde aliquotiert und nach dem Einfrieren in flüssigem N₂ bei -80 °C gelagert.

Bei der Aufnahme erster 1D ^1H Testspektren, eines 2D TROSY-HSQC und eines 3D HNCA Spektrums zeigte sich eine deutliche Verminderung der Protonensignale als Folge der Deuterierung des Proteins. Eine weitere Linienverbreiterung als Folge von Aggregationen, die z.B. durch Isotopeneffekte entstehen könnten, wurde nicht beobachtet.

Die Auflösung des TROSY-Spektrums erschien verbessert, die Anzahl auswertbarer Peaks entsprach jetzt mit ca. 95 der Anzahl der Aminosäuren des Konstrukts abzüglich der meist nicht bestimmmbaren ersten drei Aminosäuren und eventueller überlagernder identischer Signale des 6xHis-Tag. Auch das HNCA Spektrum zeigte eine für eine sequentielle Zuordnung ausreichende Auflösung. Auch ohne den Einsatz der teuren perdeuterierten Glucose konnte offenbar ein ausreichend hoher Deuterierungsgrad der Probe erreicht werden. Der Vergleich mit Spektren von Proteinproben mit bekanntem Deuterierungsgrad (Matthews 2004) lässt auf einen Deuterierungsgrad von 85-90% schließen. Bei den für die Zuordnung verwendeten Spektren wurde die Anzahl der Inkrementen und der Scans erhöht, um so technisch die bestmögliche Qualität und Auflösung der Spektren zu gewährleisten.

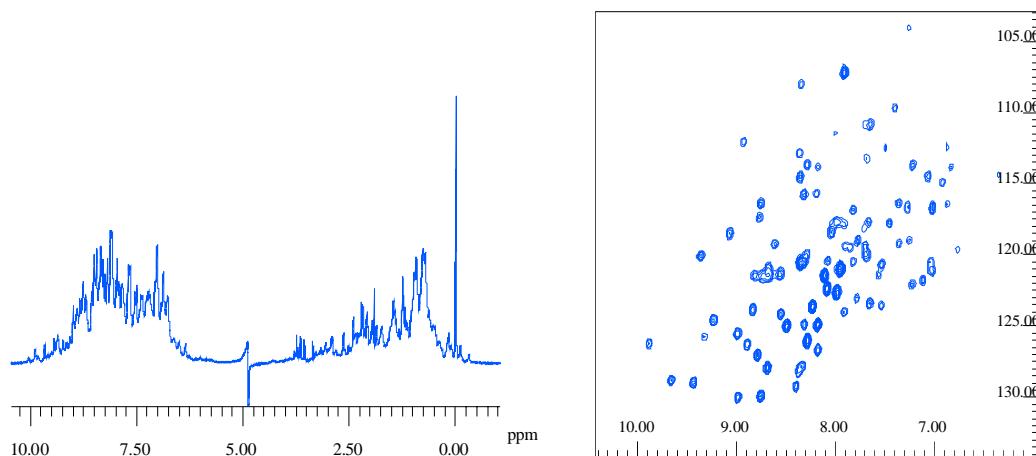


Abb. 3.11: 1D ^1H - und TROSY-HSQC Spektrum einer 3-fach markierten T1K Probe (^{15}N , ^{13}C , ^2H). Die erhöhte Zahl an Signalen im 1D Spektrum geht auf eine Aufspaltung der Signale durch J-Kopplung mit den ^{15}N -Amidstickstoffatomen zurück. NMR-detektierbare Pufferbestandteile sind im Gegensatz zu den ersten aufgenommenen Spektren nach der optimierten Rückfaltung nicht mehr vorhanden. Das TROSY-Spektrum (rechts) zeigt die gute Auflösung und Dispersion der Probe. Beide Spektren wurden in 150 mM KP_i pH 6,5 mit einer Proteinkonzentration von 1,4 mM bei 293 K aufgenommen. Eingesetzt wurde das 600 MHz Spektrometer (Bruker) mit Cryo-Probenkopf.

3.2.3.5 Aufnahme der 3D Spektren

Da die Qualität und Auflösung der Spektren nun ausreichte, um ein sequentielles Assignment der Protein Hauptkette des T1K Konstrukts durchzuführen, wurden zunächst die TROSY-Versionen der folgenden ^2H entkoppelten Tripelresonanzspektren aufgenommen: HNCA, HN(CO)CA und HN(CO)CACB.

Alle Spektren wurden mit einem Bruker 600 MHz Spektrometer mit CryoprobeTM Probenkopf und TopspinTM Softwarepaket aufgenommen. Nach der Prozessierung der Daten mit Topspin erfolgte die Auswertung der Spektren mit dem Softwarepaket Auremol, das in einer Zusammenarbeit des Lehrstuhls Kalbitzer mit der Firma Bruker Biospin GmbH entwickelt wurde (Gronwald & Kalbitzer 2004). Für die Aufnahme der Spektren wurden die folgenden Parameter verwendet: Die Probenkonzentration betrug 1,4 mM T1K Protein (¹⁵N-, ¹³C- und ²H- markiert) in 150 mM KP_i-Puffer pH 6,5. Alle Messungen wurden bei einer Probentemperatur von 293 K aufgenommen. Die verwendeten Pulsprogramme sind unter 2.9.2 beschrieben, die erstellten Peaklisten im Anhang dieser Arbeit beigefügt.

3.2.4 Das sequentielle Assignment von K_v1.4 T1K

Da bei einem T1K Tetramer mit einer molaren Masse von über 48 kDa die sogenannte klassische Vorgehensweise über HSQC Spektren nicht möglich war, wurde der Weg über die TROSY-Versionen der Tripelresonanz-Spektren mit ²H-Entkopplung gewählt (Pervushin et al. 1997). Dazu wurden die Signale des TROSY-HSQC Spektrums zunächst nummeriert und die zugehörigen Signale im HNCA und HN(CO)CA Spektrum identifiziert. Mit Hilfe der Auremol Software wurde für jedes Signal ein Strip definiert, der die chemische Verschiebung des Signals in der C-Ebene des Tripelresonanzspektrums repräsentiert. Im Falle eines HNCA-Spektrums sind zwei Signale, das des C^a der Aminosäure selbst und das des C^a Atoms der in der Polypeptidkette in N-C Richtung vorhergehenden Aminosäure zu erkennen. Theoretisch sollte das Signal der eigenen Aminosäure aufgrund der besseren Übertragung der Magnetisierung intensiver sein. Da aber die Signale im Spektrum oft aufgrund der unterschiedlichen Umgebung der einzelnen Aminosäuren innerhalb des Proteins in ihrer Intensität variieren, kann das eigene und das Vorgänger-C^a-Signal nur mit Hilfe des HN(CO)CA Spektrums identifiziert werden, in dem nur ein Signal für das C^a Atom des Vorgängers vorhanden ist. Neben der Definition der Strips wurden die chemischen Verschiebungen der Peaks gemäß der Peaknummern im TROSY-Spektrum in eine Peakliste aufgenommen.

Zunächst wurde mit Unterstützung der Auremol-Strip-Window Funktion manuell versucht, die jeweils benachbarten Aminosäuren anhand ihrer typischen chemischen Verschiebungen zu identifizieren, wobei gezielt nach Aminosäuren mit markanten, also möglichst hohen oder niedrigen Werten gesucht wurde, um einen Einstieg in die Sequenz zu finden. Konnte ein solcher Einstiegspunkt identifiziert werden, wurde durch ein Screening der zuvor definierten Strips nach den möglichen Nachbar-Aminosäuren gesucht. Durch die bekannte AS-Sequenz des Proteins erfolgte so schrittweise die Zuordnung der NMR-Signale.

Da gerade im mittleren Bereich der möglichen chemischen Verschiebungen der C^a Atome (also etwa zwischen 53 und 58 ppm) eine Identifizierung der AS nur über den Wert der

Verschiebung des C^a Atoms aufgrund von Mehrdeutigkeiten kaum möglich ist, wurde über das HN(CO)CACB Spektrum mit der chemischen Verschiebung des C^B Atoms der Vorgängeraminoäure eine weitere Information mit einbezogen. Damit konnten die meisten Mehrdeutigkeiten aufgelöst werden.

3.2.4.1 Problemfälle bei der Zuordnung der Signale

Besondere Schwierigkeiten ergaben sich in Bereichen des Proteins, für die nur sehr schwache Signale gemessen werden konnten, also am N-Terminus und bei den direkt auf Proline folgenden Aminosäuren. Bis auf die ersten beiden Reste des Kontrakts M1 und E2 und den Prolin-Nachfolger E32 konnten jedoch alle dieser Anfangssignale zugeordnet werden.

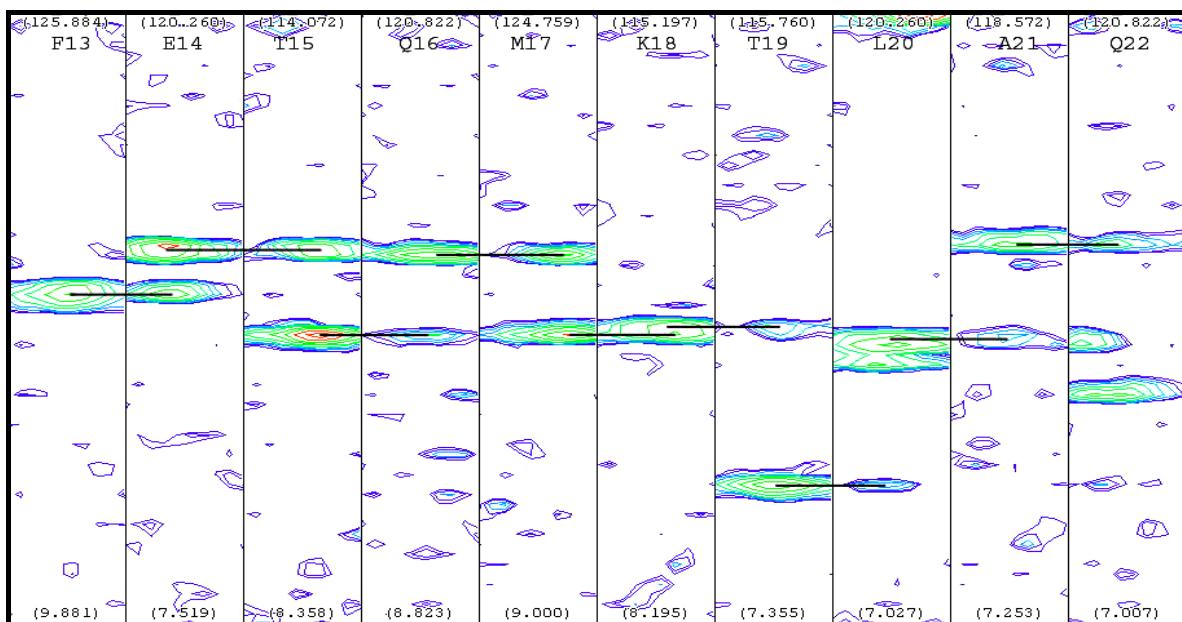


Abb. 3.12: Zuordnung der C^a Signale des Sequenzabschnittes F13 bis Q22 (entsprechend dem zweiten β -Faltblatt und dem ersten α -Helix-Segment) des T1K Konstrukts. Dargestellt sind die mit Auremol definierten Strips der C^a Signale des HNCA Spektrums. Besonders im Bereich E14 bis K18 wird deutlich, dass die HNCA-Signale allein keine eindeutige Zuordnung ermöglichen. Auch die korrekte Zuordnung von Strips mit mehr als einem Signalpaar wie bei L20 und der Ausschluss von Artefakten erforderten zusätzliche Informationen. Auffällig ist auch der Einfluss der Sekundärstruktur auf die chemische Verschiebung wie beim Vergleich von T15 (β -Faltblatt) und T19 (α -Helix) deutlich wird.

Schwer aufzulösen waren auch die Zuordnungen an den Stellen im Protein, an denen mehr als zwei gleiche Aminosäuren aufeinander folgten, da dann mindestens zwei Strips mit sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen vorlagen. Dies war neben A91-93 und H96-101 im Tag-Linker und 6xHis-Tag nur an einer Stelle in der Sequenz des Konstrukts der Fall, bei den Tyrosinen 59 bis 61. Hier zeigte sich, wie auch bei den Histidinsignalen, dass nicht nur die Zuordnung der Signale zur Sequenz nicht völlig eindeutig war, sondern auch eine

Überlagerung gleichartiger Signale vorlag. Eine weitere Differenzierung unter Berücksichtigung der durch Vergleich mit eng verwandten Proteinen ermittelten möglichen Sekundärstruktur (vgl. Abb. 3.7) war nicht möglich, da die 3Y Sequenz mitten in einem deutlich längeren α -Helix-Segment liegt.

3.2.4.2 Verbesserung der Zuordnung durch weitere NMR-Spektren

Um diese Mehrdeutigkeiten aufzulösen, wurde versucht, über die Aufnahme eines Tripelresonanzspektrums, das Kontakte über drei Aminosäurereste zeigt, eine verbesserte Zuordnung zu erreichen. Hierfür wurde ein ^2H -entkoppeltes HN(CA)NNH Spektrum unter den gleichen Aufnahmebedingungen wie bei den anderen 3D NMR-Spektren verwendet.

Leider war die Signalintensität des Spektrums trotz hoher Anzahl von Scans eher niedrig. Die auch in den anderen Tripelresonanzspektren eher starken Signale der Aminosäuren des C-terminalen Tags konnten so zwar weiter aufgelöst werden, die Tyrosine 59 bis 61 zeigten aber immer eher schwächere Signale und waren in dem neu aufgenommenen Spektrum nicht identifizierbar. Daher konnte Y60 nicht sicher zugeordnet werden, möglicherweise ist das Signal auch mit dem von Y61 überlagert.

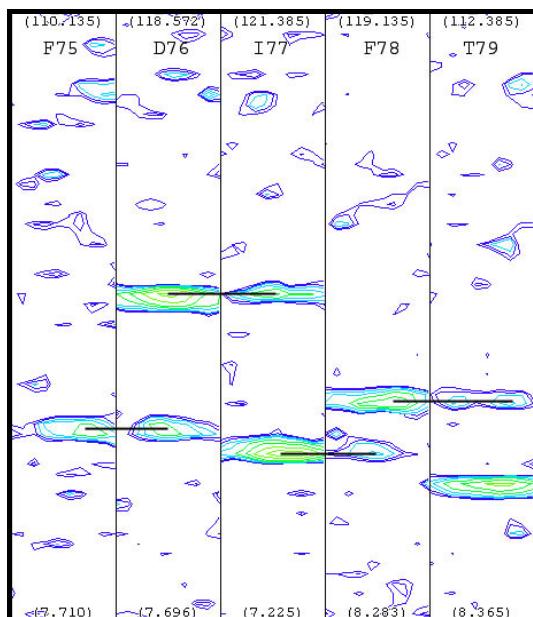


Abb. 3.13: Dargestellt ist hier ein Bereich (F75-T79) des T1K Konstrukts mit sehr eindeutiger Zuordnung (Ausschnitte der Protonen und C-Ebene des HNCA Spektrums). Strips mit relativ großen Differenzen der chemischen Verschiebung der eigenen und der Vorgänger-Aminosäure wie I77 bieten eine gute Einstiegsmöglichkeit für das sequentielle Assignment.

3.2.4.3 Überprüfung der Qualität der Zuordnung

Um die Qualität der Zuordnung zu überprüfen standen verschiedene Kontrollmöglichkeiten zur Verfügung. Zunächst wurden die chemischen Verschiebungen unter Berücksichtigung der Informationen über Sekundärstrukturelemente betrachtet. Grundlage war hier die IUPAC Liste der chemischen Verschiebungen (BMRB 1999). Von den 95 möglichen Zuordnungen

(die sechs im Konstrukt vorhandenen Proline ergeben wegen nicht vorhandener H^N-Protonen kein Signal) waren 90 erfolgt (vgl. Peakliste im Anhang), bei C^a und C^b Signalen traten keine Widersprüche mehr auf.

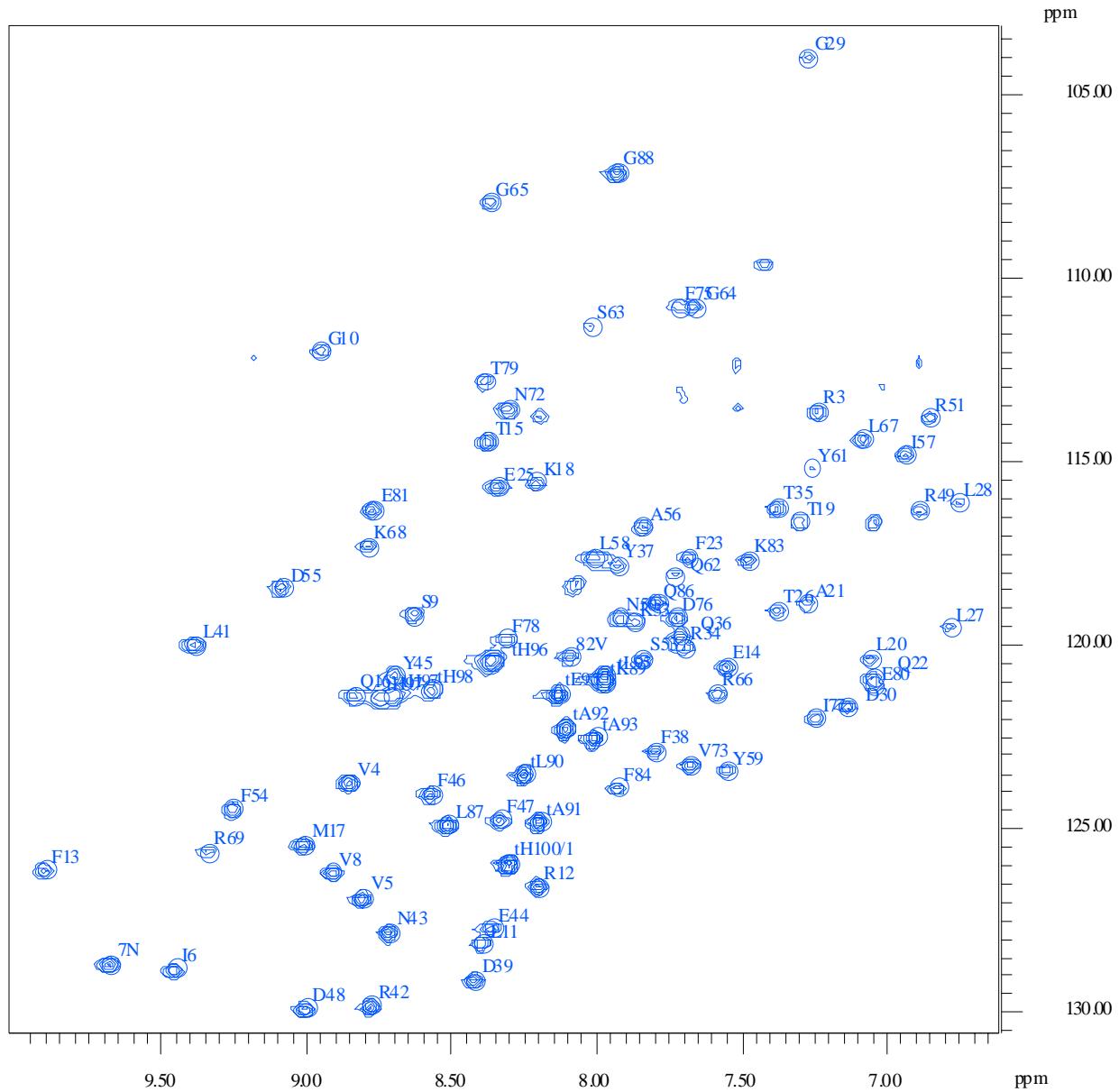


Abb. 3.14: TROSY-HSQC Spektrum von K_v1.4 T1K mit Zuordnung der Signale. Vermessen wurde eine der auch für Tripelresonanzspektren eingesetzten ¹⁵N-, ¹³C- und ²H-markierten Proben. Signale, deren Bezeichnung mit (t) beginnt wurden dem 6xHis-Tag (inkl. Linker) zugeordnet.

Acht weitere Signale für die zunächst Strips definiert worden waren, waren sehr schwach, hatten oft keine C^a oder C^b Signale oder konnten aufgrund ihrer Position im TROSY-Spektrum Argininseitenketten signale identifiziert werden.

Zusätzlich konnte nun die bisher nicht berücksichtigte Peakposition im TROSY-Spektrum herangezogen werden, um die Plausibilität der Zuordnung zu überprüfen. Die möglichen Bereiche der chemischen Verschiebung in ¹⁵N-Richtung sind zwar zu groß, um für die Zuordnung eingesetzt zu werden, bei vorhandener Zuordnung kann jedoch überprüft werden, ob die bereits einer AS zugeordneten Signale innerhalb der möglichen Bereiche der

Verschiebung liegen. Bei einer ersten Version der Zuordnung konnten so eine Reihe zweifelhafter Signale identifiziert, und die Zuordnung daraufhin korrigiert werden.

Anschließend wurden die Abweichungen der chemischen Verschiebung der C^α Signale zum *random coil* Wert berechnet und in einem Diagramm aufgetragen. Da Aminosäuren im β -Faltblatt geringere und AS einer α -Helix etwas erhöhte chemische Verschiebungen aufweisen, zeichnet sich im Diagramm die Sekundärstruktur ab. Im Vergleich mit der in Abb. 3.7 dargestellten Sekundärstruktur der in hohem Maße sequenzidentischen Kv1.2 T1 Domäne, deren Kristallstruktur bekannt ist (Minor, Berger Cell 2000; PDB 1DSX), wurde eine gute Übereinstimmung festgestellt

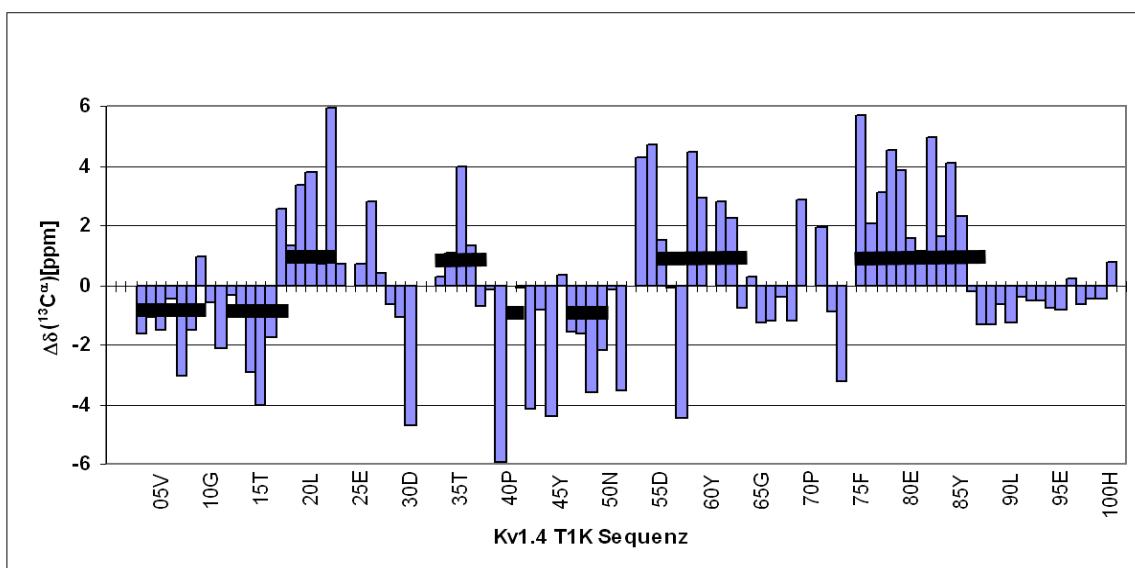


Abb 3.15: Darstellung der Abweichungen der chemischen Verschiebung der C^α Signale des Kv1.4 T1K Konstrukts vom *random coil* Wert (BMRB1999). Die Sekundärstrukturelemente, die im Alignment mit der Kv1.2 T1 Domäne (Minor, Berger Cell 2000; PDB 1DSX) ermittelt wurden sind als schwarze Balken dargestellt. Positive Abweichungen weisen auf das Vorhandenseins einer α -Helix hin, bei negativen Werten wird ein β -Faltblatt angenommen.

3.2.4.4 Abgleich mit Spektren mit bekannter Zuordnung

Durch die Veröffentlichung der NMR-Experimente mit der T1 Domäne von aKv1.1, einem Kaliumkanal der Seeschnecke *Aplysia californica* durch Baker et al. (Baker, Choe 2006) stand neben einer Abbildung eines TROSY-Spektrums auch eine Peakliste mit der Zuordnung dieses Konstrukts zur Verfügung. Aufgrund der auffälligen Ähnlichkeit der TROSY Spektren des Kv1.4 T1K Konstrukts mit dem des aKv1.1 Konstrukts wurden Vergleiche angestellt, um so die Zuordnung weiter abzusichern. Der Vergleich der Peaklisten und eines Alignments (s. Anhang) der Konstrukte zeigte, das in den Bereichen mit identischer Sequenz sehr ähnliche Werte der chemischen Verschiebung gemessen wurden.

In Bereichen in denen die Sequenzen voneinander abwichen (15 von 88 Residuen), war ein Vergleich nicht möglich. Da die für die Messungen eingesetzten Proben geringe Unterschiede in der Pufferzusammensetzung (20 mM NaPi, 50 mM NaCl) und pH-Wert (pH 7,0) aufwiesen, wurde zunächst versucht, unter den Bedingungen der Messung des aK_v1.1 Konstrukts ein TROSY-Spektrum aufzunehmen, um so eine bessere Vergleichsmöglichkeit dieser „Fingerprint“ Spektren zu erhalten. Da das T1K Konstrukt unter den neuen Pufferbedingungen jedoch instabil war, musste die ebenfalls notwendige Temperaturreihe unter den Standard-Pufferbedingungen für dieses Konstrukt durchgeführt werden. Die höchste mögliche Meßtemperatur für das T1K Konstrukt betrug 307 K. Das bei dieser Temperatur aufgenommene TROSY-Spektrum war nochmals deutlich ähnlicher zum Spektrum des aK_v1.1 Konstrukts als das zuvor bei 293 K aufgenommene.

Insgesamt betrachtet konnte nun von einer gesicherten Zuordnung des K_v1.4 T1K Konstrukts ausgegangen werden. Unsicherheiten bestanden hier vor allem am Anfang des Konstrukts, was technisch bedingt war. Die etwas unsichere Zuordnung der Reihenfolge der Histidine im 6xHis-Tag war für die weitere Arbeit unerheblich. Alle Signale die hier zugeordnet wurden, konnten eindeutig als Histidine identifiziert werden, während die restliche Sequenz keine weiteren Histidine aufweist, Verwechselungen waren also nur noch innerhalb des Tags möglich und damit unproblematisch.

3.2.5 Vorbereitung der Titrationsexperimente mit den cytoplasmatischen Domänen von K_v1.4

Nachdem die Zuordnung der K_v1.4 T1 Domäne erfolgt und abgesichert war, konnten Titrationsexperimente zur Untersuchung der Interaktionen der T1 Domäne mit dem K_v1.4 Inaktivierungspeptid und dem ebenfalls cytosolischen C-Terminus geplant und vorbereitet werden. Das Inaktivierungspeptid selbst war bereits in der Arbeitsgruppe von Prof. Bernd Fakler, Uni Freiburg, untersucht und charakterisiert worden und stand daher zur Verfügung. Ein Konstrukt des K_v1.4 C-Terminus wurde von Doris Wiedemann (Wiedemann 2005) im Rahmen einer Diplomarbeit kloniert.

3.2.5.1 Das K_v1.4 IP Konstrukt

Bei dem verwendeten K_v1.4 IP Konstrukt handelt es sich um das Konstrukt, das der 2003 von R. Wissmann und B. Fakler veröffentlichten Struktur der sogenannten Tandem-Inaktivierungsdomäne (Wissman, Fakler 2003, PDB 1KN7) zu grunde liegt. Es besteht aus den ersten 75 AS des K_v1.4 Proteins. Das Konstrukt besitzt zwei helikale Segmente (AS 20 bis AS 38 und AS 40 bis AS 50), die über einen flexiblen Linker verbunden sind, einen ungefalteten N- und einen sehr flexiblen und glycinreichen C-Terminus.

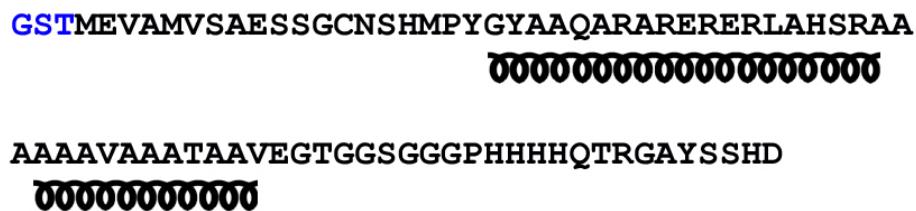


Abb. 3.16: Das K_v1.4 IP Konstrukt umfasst die ersten 75 AS des K_v1.4 Kanalproteins. Das Konstrukt trägt am N-Terminus drei zusätzliche Aminosäuren, die den Überhang der Thrombinschnittstelle darstellen. Die beiden α-helikalen Sekundärstrukturelemente sind entsprechend markiert. Das Konstrukt hat einen theoretischen pl von 7,04 bei einer molaren Masse von 7,79 kDa.

Eine ¹⁵N-markierte Probe des Peptids für die Titration mit dem T1K Konstrukt konnte von der Arbeitsgruppe von Prof. Fakler, Freiburg, zur Verfügung gestellt werden. Weiteres unmarkiertes Material für die weiteren Titrationsexperimente musste jedoch in größerer Menge exprimiert werden. Dazu wurden die Expressions und Aufreinigungsbedingungen des Konstrukts überprüft, an die veränderten Pufferbedingungen angepasst und anschließend optimiert.

Das Konstrukt lag in dem Vektor pET41a (Novagen) vor, besaß also N-terminal einen 6xHis- und GST-Tag. Der ebenfalls im Plasmid codierte S-Tag war bei der Klonierung entfernt worden. Aufgrund der relativ geringen Expression im ursprünglich verwendeten *E. coli* BL21(DE3) Expressionsstamm wurde zunächst aufgrund der bisherigen guten Erfahrungen mit Kaliumkanalkonstrukten von Säugetieren, das Expressionsplasmid isoliert und in den bereits zuvor verwendeten *E. coli* Expressionsstamm Rosetta™ pLysS transformiert. Da dieser Stamm die bei mammaler DNA häufig auftretenden, bei *E. coli* aber seltenen Codons durch zusätzliche tRNAs komplementiert, konnte so die Expression deutlich gesteigert werden.

Das ursprüngliche Aufreinigungsprotokoll sah eine zweistufige Aufreinigung über die beiden Affinitäts-Tags mit anschließendem Thrombinverdau zur Entfernung des gesamten Tags vor. Dazu musste das Protein jedoch mehrfach umgepuffert werden. Insgesamt zeigten sich bei der Durchführung des Protokolls relativ große Proteinverluste, vermutlich auch durch Oxidation, und ein hoher Zeitaufwand. Eine Überprüfung des Pellets des Aufschlusses zeigte zudem, dass ein relativ großer Anteil des exprimierten Proteins in Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies) vorlag. Daher wurde der Versuch einer denaturierenden Reinigung analog zu den weiteren Konstrukten über eine Ni-NTA Matrix unternommen. Die anschließende Rückfaltung erfolgte direkt in einen Puffer (150 mM KP_i, 20 mM DTE, pH 7,3) der sowohl die Stabilität des Proteins als auch die Aktivität der für die anschließende Entfernung des Tags eingesetzten Thrombinprotease gewährleistete. Es konnte eine Rückfaltausbeute von 80%

erreicht werden. Bei dem ausgefallenen Protein handelte es sich größtenteils um Verunreinigungen, die bei der Affinitätsreinigung noch nicht entfernt werden konnten, aber unter den Bedingungen der Rückfaltung nicht löslich waren. Nach dem Thrombinverdau erfolgte die Nachreinigung und Entfernung von Tag und Thrombin über eine Gelfiltration mit einer Superdex 75 Matrix (GE Healthcare). Dabei wurde gleichzeitig auf den KP_i Standardpuffer (150 mM KP_i, pH 6,5) mit zusätzlich 20 mM DTE als Reduktionsmittel umgepuffert. Da das Thrombin vollständig entfernt werden konnte, konnte auf die ursprünglich vorgesehenen Proteaseinhibitoren verzichtet werden.

Das neue Aufreinigungsprotokoll erwies sich als deutlich effektiver als das bisher verwendete. Durch den Wegfall der Aufreinigung über die GSH Säule sinken auch die Kosten der Aufreinigung. Das K_v1.4 IP Konstrukt stand nun in ausreichender Menge und gleichbleibend guter Qualität zur Verfügung.

Gleichzeitig wurde das Assignment des K_v1.4 IP von R. Wissmann, basierend auf ¹⁵N HSQC Spektren (aufgenommen bei pH 4,4) mit den unter den adaptierten Pufferbedingungen aufgenommenen ¹⁵N TROSY HSQC-Spektren abgeglichen. So konnte die vorhandene Zuordnung auf die veränderten Meßbedingungen übertragen werden. Erwartungsgemäß zeigten sich im Bereich der Signale der Histidine H61-H64 durch die Deprotonierung der Histidinreste deutliche Veränderungen der Verschiebungen in H-Richtung. Die übrigen Signale konnten unter Berücksichtigung der relativ geringen systematischen Veränderungen, die durch die unterschiedlichen Spektren bedingt waren, problemlos identifiziert werden.

3.2.5.2 Das K_v1.4 C-Terminus Konstrukt

Die Klonierung des K_v1.4 C-Terminus wurde von Doris Wiedemann im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt (Wiedemann 2005). Das Konstrukt mit der besten Löslichkeit zeigte auffallend ähnliche Lösungsbedingungen wie das zuvor klonierte T1K Konstrukt der T1 Domäne: 150 mM KP_i bei pH 6,5, zusätzlich wurden 20 mM DTE eingesetzt, da das Konstrukt Cysteine enthält, die die Bildung von Dimeren durch Disulfidbrücken ermöglichen. Diese Dimere waren im Gelfiltrationsschritt der Aufreinigung nachweis- und entfernbare.

Die Aufreinigung des mit Hilfe des pET 19b Plasmids in *E.coli* Rosetta™ pLysS exprimierten Konstrukts erfolgte denaturierend (vgl. T1K Konstrukt) über den hier N-terminalen 10xHis-Tag. Die ebenfalls enthaltene Enterokinase-Schnittstelle, die eine Entfernung des Tags ohne Überhang-Aminosäuren ermöglichen sollte, erwies sich als unbrauchbar. Die erforderlichen Verdaubedingungen (mindestens pH 7,5, phosphatfreier Puffer) führten zur Präzipitation des Proteinkonstrukts. Zusammen mit dem 10xHis-Tag und der Linkersequenz mit der

Enterokinase-Schnittstelle hat das Konstrukt eine molare Masse von 12,8 kDa. Da das Konstrukt den C-Terminus in einer Länge von 84 AS (E571 bis V655) umfasst, erhielt es die Bezeichnung K_v1.4 C84 oder kurz C84.

MGHHHHHHHHHHSGHIDDDDKHMETENEEQTQLTQ
NAVSCPYLPNSNLKKFRSSTSSSLGDKSEYLEMEEG
VKESLRGKEEKCQKGDDSETDKNNCSNAKAVETDV

Abb. 3.17: Das K_v1.4 C84 Konstrukt ist insgesamt 108 AS lang mit einer molaren Masse von 12,8 kDa. Die rot markierte Sequenz besteht aus dem 10xHis-Tag und der Enterokinaseschnittstelle, blau markiert ist das hochkonservierte C-terminale PDZ-Bindemotiv, dessen Funktionalität in NMR-Titrationsexperimenten nachgewiesen werden konnte (Meyer 2005)

Das Konstrukt beginnt direkt nach dem Ende der S6 Helix, und damit der Transmembran-Domäne. Verschiedene Sekundärstruktur-Vorhersageprogramme ergaben mehr oder weniger lange helikale Strukturen im Bereich der unmittelbar auf die S6 Helix folgenden Sequenzbereiche.

Nach dem erfolgten sequentiellen Assignment des Konstrukts durch Simon Meyer (Meyer 2005, Diplomarbeit) konnten jedoch keine Hinweise auf stabile Sekundärstrukturelemente gefunden werden.

3.2.5.3 Erstellung eines Homologiomodells für das K_v1.4 T1 Tetramer

Um die Ergebnisse der geplanten Titrationsexperimente besser beurteilen zu können, und um eine bessere Nutzung der durch das sequentielle Assignment gewonnenen Informationen zu gewährleisten, war eine räumliche Darstellung des K_v1.4 T1K Konstrukts erforderlich. Da die für die Strukturrechnung notwendigen NMR-Daten aufgrund der Größe des Tetramers noch nicht ausreichten (keine NOE-Kontakte), wurde ein Homologiomodell erstellt. Dieses Homologiomodell basiert auf der Kristallstruktur des Tetramers der K_v1.2 T1 Domäne, die von Minor et al. gelöst wurde (Minor, Berger 2000; PDB 1QDV). Diese Struktur mit einer Auflösung von 1,6 Å wurde als Vorlage verwendet, da sie über eine zu 88% identische Sequenz verfügt. Bei den abweichenden AS handelt es sich um konservative Mutationen, die meist einzeln auftreten. Eine sehr ähnliche Tertiär- und Quartärstruktur ist daher anzunehmen. Das Alignment ist im Anhang dargestellt.

Mit Hilfe der Homology-Modeling-Wizzard Funktion von Auremol™ (Gronwald & Kalbitzer 2004) wurden die für die eigentliche Modellrechnung in CNS (Brünger 1998) erforderlichen Alignment-Files erstellt. Nach der anschließenden CNS-Rechnung wurden die

energieärmsten Modellstrukturen identifiziert und mit Hilfe von MolMolTM dreidimensional dargestellt.

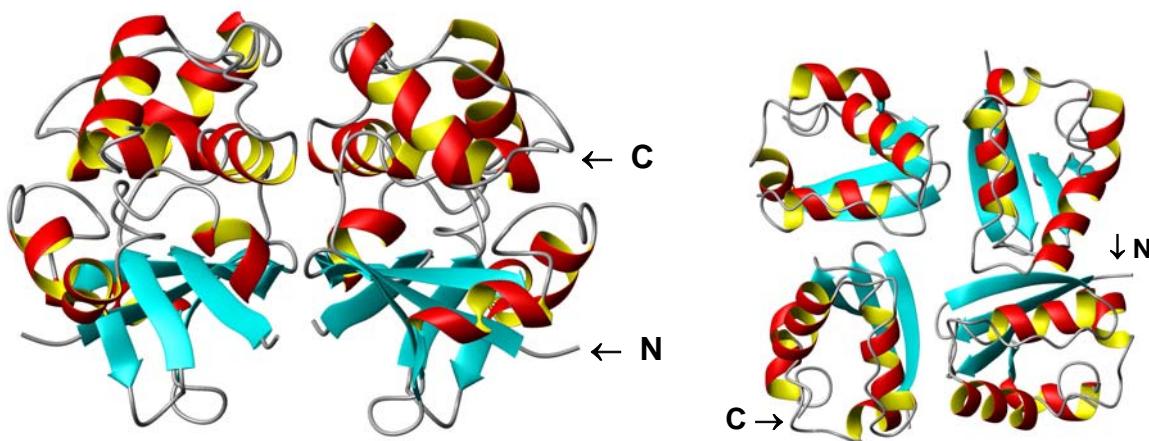


Abb. 3.18: Homologiemodell des Kv1.4 T1K Konstrukts. Das Modell beruht auf der Kristallstruktur der Kv1.2 T1 Domäne (Minor, Berger 2000; PDB 1QDV). Diese Struktur mit einer Auflösung von 1,6 Å ist zu 88% sequenzidentisch mit dem Kv1.4 T1K Konstrukt. MolMol-Darstellung als Ribbon-Modell. Zur Orientierung sind N- und C-Termius markiert. Der zum Cytosol ausgerichtete N-Terminus ist gemäß der Konvention nach unten orientiert. Die typischen Strukturelemente einer T1 Domäne mit dem N-terminalen antiparallelen β-Faltblatt und dem ausschließlich α-helikalen C-terminalen (membranzugewandten) Bereich sind deutlich erkennbar.

3.2.6 Titrationsexperimente: Interaktionen von Kv1.4 T1K mit den cytosolischen Domänen

Auf der Basis der nun vorhandenen Konstrukte und ihrer sequentiellen Zuordnungen wurden Titrationsexperimente durchgeführt, um so direkt die Wechselwirkungen zwischen der Kv1.4 T1 Domäne und dem IP und C-Terminus zu bestimmen. Dazu wurde ¹⁵N-markiertes Kv1.4 T1K Protein zunächst mit den beiden unmarkierten Peptiden einzeln titriert, anschließend wurde eine kombinierte Titration durchgeführt. Um auch die Interaktionsstellen der Peptide zu bestimmen, wurden diese ¹⁵N-markiert eingesetzt und mit der unmarkierten T1 Domäne titriert.

3.2.6.1 Durchführung der Experimente

Zur Durchführung der Titrationsexperimente wurde das jeweils zu beobachtende Proteinkonstrukt ¹⁵N-markiert eingesetzt, im Falle des 48 kDa großen T1K Tetramers wurde zusätzlich deuteriertes Protein verwendet, um die entsprechend gute Auflösung zu gewährleisten. Die Konzentration des vorgelegten Proteinkonstrukts wurde auf 0,5 mM eingestellt, beim T1K Konstrukt bezieht sich dieser Wert auf die Monomer-Konzentration.

Die Titrationen wurden im 150 mM KP_i Puffer bei pH 6,5 durchgeführt, dem DTE ad 20 mM zugesetzt wurde. Alle Proteine lagen in der gleichen Pufferlösung vor, Artefakte durch unterschiedliche Salzkonzentrationen, pH-Veränderungen und neu eingebrachte Pufferzusätze konnten so vermieden werden.

Nach der Aufnahme eines ¹⁵N TROSY-HSQC Spektrums als Referenzspektrum erfolgte die schrittweise Zugabe des zweiten Proteinkonstrukts. Nach jeder Zugabe wurde erneut ein Spektrum aufgenommen und mit dem Referenzspektrum verglichen. Die Höhe der Zugabemenge wurde experimentell bestimmt und die Zugabeschritte entsprechend der bisherigen Ergebnisse angepasst. Die Titrationen wurden bis maximal zum 6-fachen molaren Überschuss des zugegebenen Proteinkonstrukts geführt. Das zutrittierte Proteinkonstrukt wurde in hoher Konzentration eingesetzt, um Artefakte durch zu starkes Verdünnen des vorgelegten Proteins zu vermeiden. Die zugegebene Proteinlösung wurde vor Beginn der Messreihe aliquotiert und nach Schockfrosten bei -80 °C gelagert.

Bei höheren Proteinkonzentrationen (die Proteingesamtkonzentration in der Probe lag bei bis zu 6 mM) entstanden durch die zunehmende Viskosität der Probe vermehrt Artefakte. Zum Teil war auch die Überlagerung der Signale des vorgelegten ¹⁵N markierten Proteins durch Signale zu beobachten, die durch die natürliche Häufigkeit von ¹⁵N im unmarkierten, zutrittierten Proteinkonstrukt hervorgerufen wurde.

Die ¹⁵N TROSY-HSQC Spektren wurden mit dem Pulsprogramm *trosyetc3gpphs19* (Bruker Biospin GmbH) durchgeführt.

3.2.6.2 Auswertung der Titrationsexperimente

Die Daten der Spektren wurden zunächst entsprechend der Verdünnung der Probe und der eventuell abweichenden Aufnahme- (receiver gain) und Prozessierungsparameter (NCproc) korrigiert.

Die Titrationsexperimente wurden anhand der mit Auremol erstellten Peaklisten ausgewertet, also die Veränderung der Peakposition im ¹⁵N TROSY-HSQC Spektrum in der N- und H-Dimension bestimmt und graphisch dargestellt.

Dabei wurde der $\Delta\delta$ Wert einer Verschiebung nach der folgenden Methode berechnet: Der Protonenshift geht mit der Gewichtung 1,0 in die Rechnung ein, die Veränderung in der ¹⁵N-Dimension wird mit dem Faktor 0,1 gewichtet. Der $\Delta\delta$ (¹⁵N, ¹H) Wert ergibt sich also wie folgt:

$$\Delta\delta (\text{¹⁵N, ¹H}) = [\Delta\delta (\text{¹H})^2 + (0,1\Delta\delta(\text{¹⁵N}))^2]^{1/2}$$

Abweichend von der Berechnung bei Baker et al. (Baker, Wüthrich, Choe 2006) wurde für $\Delta\delta$ (¹⁵N) der Gewichtungsfaktor 0,1 statt 0,2 verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden

durch Vergleich mit dem Mittelwert und der Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert wie folgt bewertet:

Signalverschiebungen mit $\Delta\delta$ ($^{15}\text{N}, ^1\text{H}$) Werten, die deutlich über der Summe von Mittelwert und Standardabweichung liegen, wurden als starke Verschiebungen bzw. Wechselwirkungen bezeichnet und sind in allen folgenden Abbildungen grün markiert. Verschiebungen im Bereich der Summe von Mittelwert und Standardabweichung (Abweichung +/- 15 %) waren klar vom Rauschen der Messung unterscheidbar, sie sind als deutliche Verschiebungen bezeichnet und werden blau dargestellt. Möglicherweise signifikante Verschiebungen, die größer als die Summe von Mittelwert und 50 % der Standardabweichung sind, werden grau dargestellt.

Die ebenfalls auftretenden Veränderungen der Peakvolumina wurden durch die Integration mit AuremolTM bestimmt. Hierbei wurden die Integrationsparameter mehrfach optimiert, da die default-Werte für die verwendeten Spektren zu klein gesetzt waren. Im Vergleich zu den üblicherweise integrierten HSQC Spektren monomerer Proteine ähnlicher Größe sind die K_v1.4 T1K TROSY-HSQC Signale sehr breit. Als maximale Peakausdehnung für die Integration wurde in der Protonen-Dimension 60 Hz und in der N-Dimension 80 Hz festgelegt. Durch Überlagerungen mit benachbarten Signalen oder mit den durch die natürliche Häufigkeit von ^{15}N bei höheren Konzentrationen des unmarkierten Proteins entstehenden Restsignalen entstehen jedoch oft fehlerhaft integrierte Signale, so dass eine manuelle Durchsicht erfolgen musste. Signale mit verhältnismäßig kleinen Volumina erwiesen sich als besonders anfällig für Verzerrungen des Signals und wurden daher ebenfalls gründlich überprüft und gegebenenfalls in der Auswertung nicht berücksichtigt.

3.2.6.3 Titration des K_v1.4 T1K Konstrukts mit dem K_v1.4 Inaktivierungspeptid

Die Titration des K_v1.4 T1K Konstrukts mit dem K_v1.4 Inaktivierungspeptid wurde sowohl bei 283 K als auch bei 293 K durchgeführt. Dabei zeigten sich in der Messung bei 293 K etwas deutlichere Ergebnisse. Die Ergebnisse von zwei der insgesamt drei durchgeföhrten Messreihen die bis zum 5,7-fachen molaren Überschuss des IP geföhrt wurden, konnten daher zusammengefasst werden. Dazu wurde der Mittelwert der beiden getrennt bestimmten $\Delta\delta$ ($^{15}\text{N}, ^1\text{H}$) Werte gebildet und anstatt der Einzelwerte zur Erstellung eines Säulendiagramms verwendet, das einen Überblick über die Ergebnisse vermittelt.

Die Auswertung nach den Signalvolumina zeigte zwar Parallelen zur Auswertung der Signalverschiebungen, da jedoch nur etwa 50 % der Signale auswertbar waren, blieben die Ergebnisse hier sehr lückenhaft.

In Abbildung 3.19 sind die Ergebnisse der Verschiebungen im Diagramm und zusätzlich mit der Bewertung nach den in 3.2.6.2 eingeföhrten Kriterien an der Sequenz des T1K

Konstrukts dargestellt. Dabei zeichnen sich bereits drei Bereiche mit besonders deutlichen Verschiebungen ab: F38 bis E44, R62/S63 und R69 bis T79. Diese deutlichen Signale sind häufig flankiert von den grau markierten, zunächst als unsicher eingestuften Signalen. Diese Signale, die nur kleine Veränderungen zeigten, sind nicht statistisch, sondern spezifisch verteilt und werden daher in die Auswertungen mit einbezogen. Die hier nicht dargestellten 6xHis-Tag- und Linkersequenzen zeigten in der Titration keine signifikanten Veränderungen.

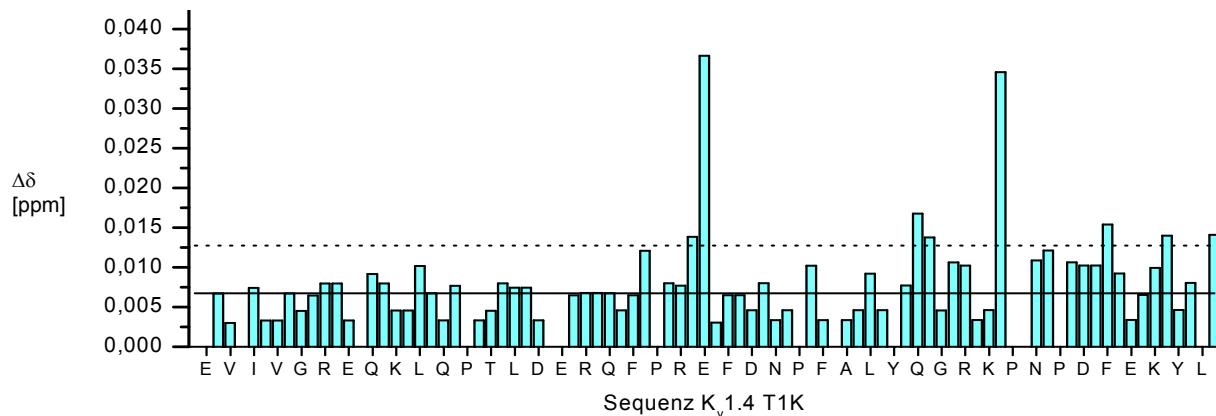
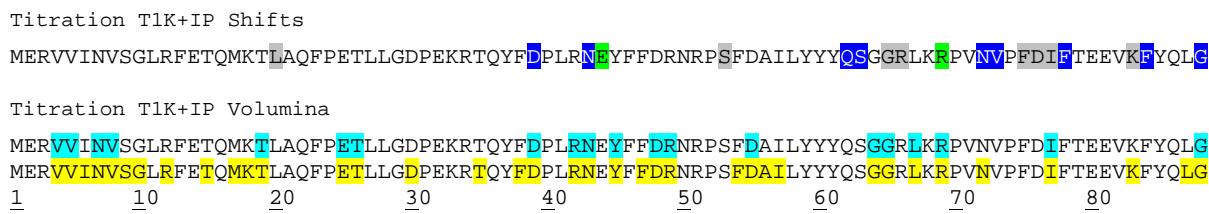
A**B**

Abb. 3.19: Darstellung der Ergebnisse der Titration des K_{1.4} T1K Konstrukt mit dem Inaktivierungspeptid. **(A)** Aufgetragen sind die $\Delta\delta$ (¹⁵N, ¹H) Werte mit dem Gewichtungsfaktor 0,1 für die ¹⁵N Shifts gegen die Sequenz des T1K Konstrukt. Der Mittelwert ist als durchgezogene Linie, die Summe von Mittelwert und Standardabweichung punktiert dargestellt. Neben den sehr starken Wechselwirkungen von E44 und R69 sind vor allem im Bereich ab Q62 allgemein deutlich größere Verschiebungen zu beobachten als im N-terminalen Bereich. Da zwei Messungen zur Verfügung standen, wurden diese getrennt ausgewertet und die Werte für die einzelnen AS anschließend gemittelt.

(B) Zusammengefasste Signalverschiebungen und Volumenveränderungen (nur bei 293 K) in der Titration mit dem IP, dargestellt auf der Sequenz des T1K Konstrukt. In der ersten Zeile sind die Signalverschiebungen dargestellt. Reste mit deutlichen Verschiebungen sind blau, solche mit starken Wechselwirkungen grün hinterlegt. Grau hinterlegt sind grenzwertige Verschiebungen. Eine Häufung der Wechselwirkungen um die Sequenzpositionen 43 und 73 ist deutlich erkennbar. In den beiden unteren Zeilen ist die Auswertung nach der Volumenveränderung der NMR-Signale dargestellt. Aminosäurereste, deren Signale auswertbar sind, sind gelb unterlegt, blau unterlegt sind die Reste, deren Signal in der Titration auf unter 78% der Ausgangsintensität abfiel.

Die ebenfalls in Abbildung 3.19 dargestellten Volumenveränderungen (der Schwellenwert von 78% ist willkürlich festgelegt) zeigen weniger eindeutige Ergebnisse. Die Signale der Aminosäuren mit deutlichen Signalverschiebungen waren hier oft nicht auswertbar. Unter Berücksichtigung der graphisch dargestellten Ausgangsdaten (Abbildung 3.20) die bereits um die Daten der nicht auswertbaren Signale bereinigt sind, wurde deutlich, dass die

Qualität dieser Daten eine gleichwertige Einbeziehung in die Auswertung der Titration nicht zulässt.

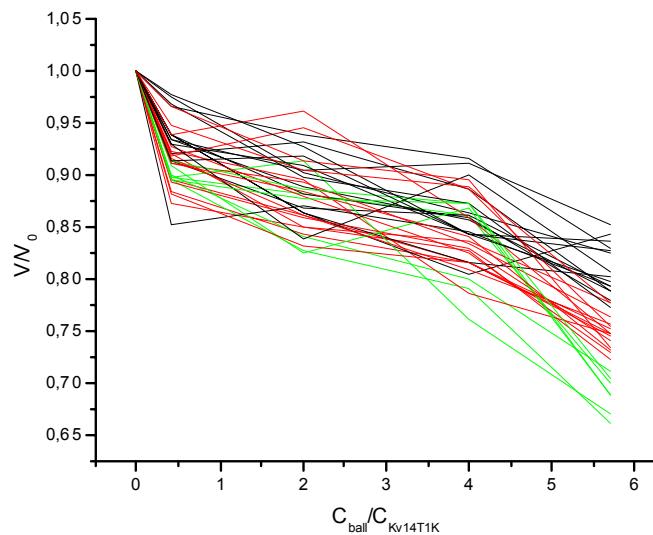


Abb. 3.20: Abbildung der Volumenveränderungen in der Titration des T1K Konstrukts mit dem Inaktivierungspeptid. Aufgetragen ist das normierte Volumen der T1K-Signale gegen das molare Verhältnis von IP zu T1K-Monomer. Rot dargestellt sind Signale, deren Volumen bei 5,7-fachem Überschuss des IP weniger als 78% des Ausgangswertes betrug, grün Signale, deren Volumen unter 72% lag. Der Verlust von etwa 1/10 des Ausgangswertes der Signalvolumina, der bei den am geringsten veränderten Signalen zu beobachten ist, geht wahrscheinlich auf Proteinpräzipitation zurück.

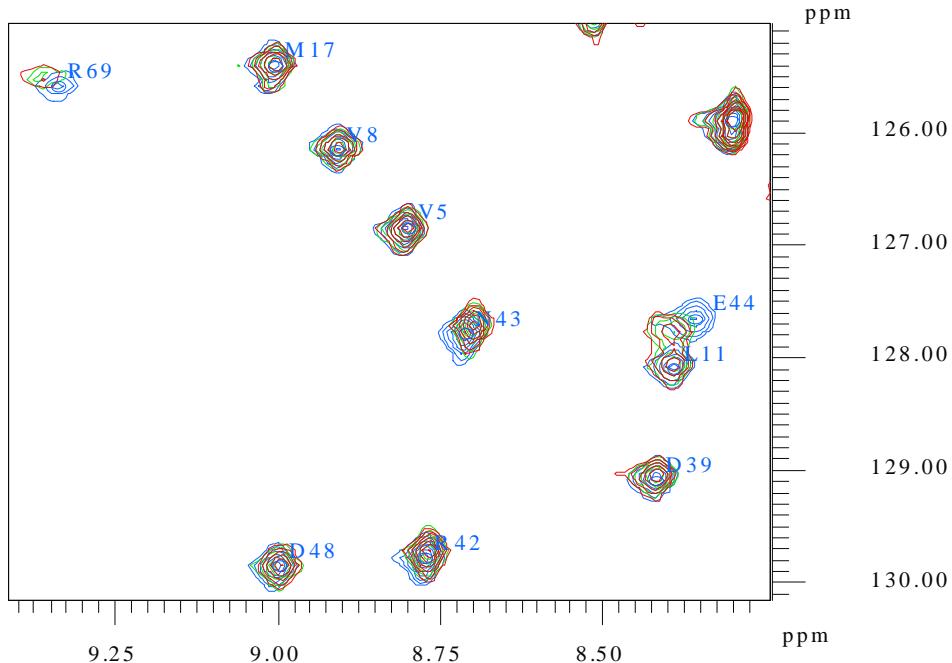


Abb. 3.21: Abbildung einiger typischer Signalverschiebungen in der Titration des K_v1.4 T1K Konstrukt mit dem IP. Das Referenzspektrum mit der Zuordnung ist blau dargestellt, das bei 4-fachem molaren Überschuss des IP aufgenommene Spektrum grün, bei 5,7-fachem IP Überschuss rot dargestellt. Beispiele für Signale mit starken Verschiebungen sind E44 und R69, N43 wurde als deutliche Verschiebung klassifiziert. Die Verschiebungen bei D48 und R42 liegen bereits unterhalb des Schwellenwertes für eine mögliche Interaktion. Die Signale von V8 und V5 sind nicht verschobene Referenzsignale. Um Intensitätsunterschiede durch Verdünnung und Prozessierung auszugleichen, wurden die Signale anhand der nicht verschobenen Referenzsignale und der Signale des Tag-Linkers auf die gleiche Breite der Peakbasis eingestellt.

Selbst diese bereinigten Signale zeigen eine deutliche Streuung, der Abfall der Signalintensität erfolgt sehr ungleichmäßig, ein Hinweis auf fehlerbehaftete Signale. Ebenfalls problematisch war die Festlegung des Schwellenwertes für eine mögliche Interaktion. Für die Abbildung 3.20 wurden für eine übersichtlichere Darstellung willkürlich Grenzwerte für die Farbgebung der Signale festgelegt, es zeichnen sich keine Signalgruppen mit ähnlichem Verhalten ab.

Die Auswertung der Signalverschiebungen erwies sich dagegen als sehr zuverlässig. Vor allem konnten ausreichend nicht verschobene Signale identifiziert werden, so dass eine zuverlässige Referenzierung der Daten möglich war. In Abb. 3.21 sind einige typische Signalverschiebungen anhand eines Ausschnitts des ^{15}N -TROSY HSQC Spektrums dargestellt.

3.2.6.4 Überprüfung der Auswertung

Um mögliche Artefakte zu identifizieren, wurden die Signale, für die Verschiebungen festgestellt wurden, genauer analysiert. Zunächst sollte ein Effekt der während der Titration ansteigenden Gesamtproteinkonzentration z.B. durch erhöhte Viskosität der Lösung oder geringere Hydratation der Proteine ausgeschlossen werden. Eine systematische Verschiebung oder Verbreiterung aller Signale konnte jedoch nicht festgestellt werden, die Verschiebungen erfolgen in unterschiedlichen Richtungen. Trotz makroskopisch zu beobachtender Zunahme der Viskosität einer Lösung des T1K Konstrukts konnten außer der erwarteten leicht verminderten Signalintensität durch die Verdünnung des vorgelegten T1K Proteins keine signifikanten Veränderungen der Spektren gefunden werden.

Um die Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Verschiebungen im Verlauf der Titration besser einschätzen zu können, wurde in Abb. 3.22 der Wert der Verschiebung gegen die Konzentration des IP aufgetragen (nur Werte der Meßreihe bei 293 K). Dabei zeigte sich zunächst ein sehr gleichmäßiges Bild, was auf eine geringe Fehlerbehaftung der Messwerte im Vergleich mit den Werten der Signalintensität hinweist. Ausgewertet wurden die Signale der zwei stark wechselwirkenden Reste E44 und R69, sowie eine Auswahl der benachbarten deutlich wechselwirkenden Reste.

Zur Abschätzung der Bindungskonstante K_D des Inaktivierungspeptids wurde unter der Annahme einer Bindung im Verhältnis 1:1 von T1K und IP ein Fit zu den Datenreihen erstellt. Daraus ergab sich für die stark wechselwirkenden Reste E44 und R69 eine K_D Wert von 1,37 mM, die übrigen Reste, die bereits bei 4-fachem Überschuss des IP (also bei einer Konzentration von 1,92 mM des IP) eine Sättigung zeigten, lag die Bindungskonstante mit 0,10 mM bis 0,14 mM deutlich niedriger. Es können also eindeutig zwei Gruppen von Resten, die das IP unterschiedlich stark binden, unterschieden werden.

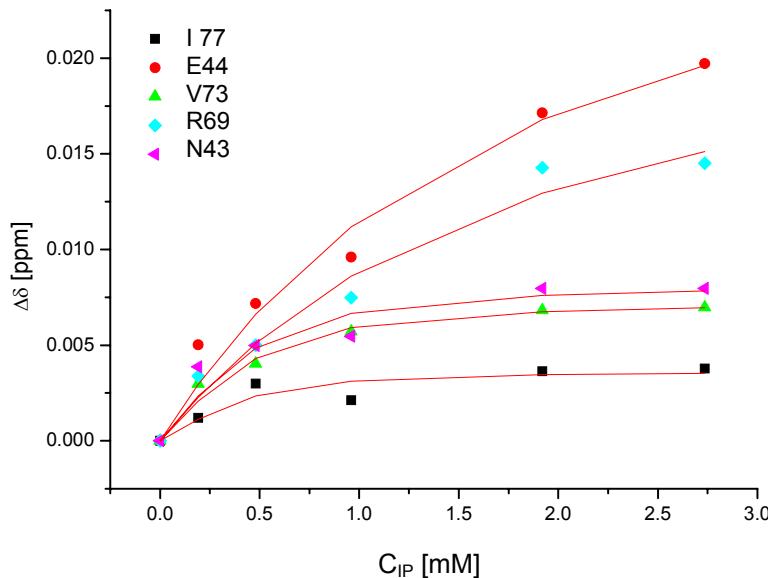


Abb. 3.22: Beträge der Verschiebungen der fünf ausgewählten deutlich oder stark verschobenen Signale des K_v1.4 T1K Konstrukts aufgetragen gegen die Konzentration des IP. Die T1K-Monomer-Konzentration ist 0,48 mM. Für die AS E44 und R69 ergibt sich unter Annahme eines Bindungsverhältnisses von 1:1 eine Dissoziationskonstante von 1,3 mM, die übrigen, weniger stark shiftenden Reste weisen eine Dissoziationskonstante von 0,10 bis 0,14 mM auf. Die dem Fit zugrunde liegende Gleichung und die weiteren Daten sind im Anhang aufgeführt.

Bei den Resten E44 und R69 ist bei 2-fachem Überschuss des IP zu beobachten, dass die Messwerte von der Fitkurve abweichen, dies kann durch Rauschen verursacht sein oder aber auf eine komplexere Bindungskinetik als das angenommene 1:1 Modell hinweisen.

3.2.6.5 Darstellung der Ergebnisse am Homologiemodell

Um festzustellen, ob die Aminosäurereste, die Signalverschiebungen zeigten, auch in räumlichen Zusammenhang stehen, wurden die Ergebnisse am Homologiemodell des T1K Konstrukts dargestellt. Dabei zeigte sich, dass sowohl ein kleiner Bereich mit AS 41-44 an der N-terminalen Oberfläche des Proteins als auch größere Flächen an der C-terminalen Oberfläche des Konstrukts zwischen AS 69 und 79 zusammenhängende Bereiche bilden, die mit dem IP wechselwirken.

Auch die Bindungsflächen des T1K Tetramers wurden mit in die Betrachtung einbezogen. Bei der Darstellung des Homologiemodells wurde das Ribbon-Modell verwendet, um auch einen Einblick in das innere des Komplexes zu erhalten. Dabei zeigte sich, dass die im C-terminalen, *in vivo* der Membran zugewandten Bereich wechselwirkenden Gruppen von AS-Resten im Inneren des Proteinkomplexes miteinander in Kontakt stehen. Ein kooperativer Bindungsmechanismus ist damit möglich. Weiterhin fielen einige einzelne Aminosäurereste auf der Außenseite des Tetramers auf, die sich ähnlich einer Perlenkette in der Mitte des

Monomeres vom N- zum C-Terminus des Komplexes spannen. Diese Reste bilden eine zeitweise unterbrochene Verbindungsleitung zwischen den beiden Zentren der Wechselwirkung am N- und C-Terminus.

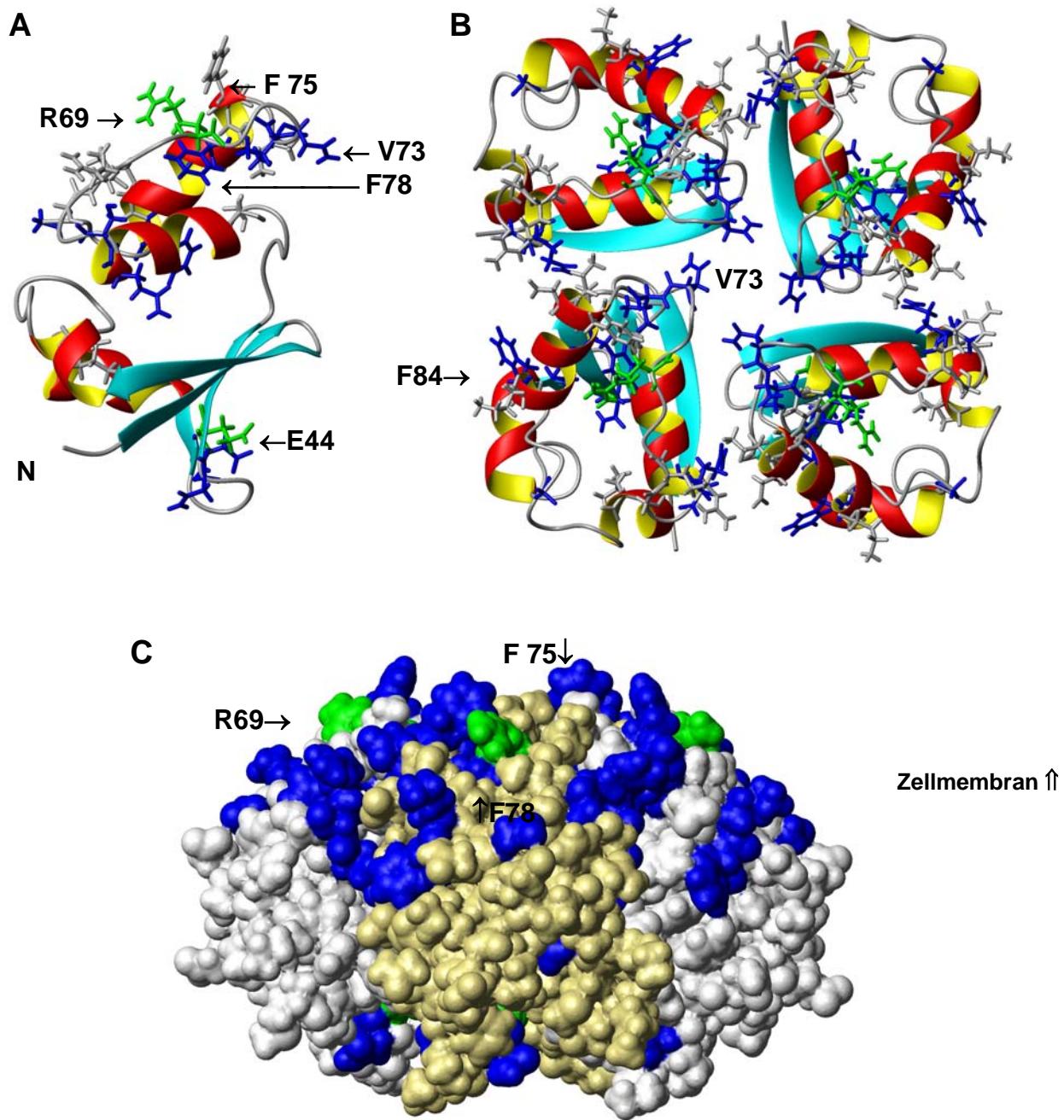


Abb. 3.23: Darstellung der Ergebnisse der Titration des Kv1.4 T1K Konstrukts mit dem Inaktivierungspeptid am Homologiemodell von T1K (MolMol™ Darstellungen). **(A)** Monomer als Ribbon-Modell. Der helikale C-terminale Abschnitt, der sich im Kanalkomplex in der Nähe der Zellmembran befindet, ist nach oben ausgerichtet. Stark wechselwirkende Reste sind grün markiert, deutlich wechselwirkende Reste blau, schwach wechselwirkende Reste grau eingezeichnet. **(B)** Aufsicht auf das Tetramer, von der Membranseite aus gesehen. Neben R69 sind besonders die zur Achse des Tetramers weisenden Reste von V73 gut erkennbar. **(C)** Oberflächendarstellung des Tetramers, die Orientierung entspricht dem Monomer (A). Jeweils zwei Monomere wurden beige farbig hervorgehoben. Viele der wechselwirkenden Reste ragen deutlich aus der Oberfläche hervor. Die in (A) und (B) grau markierten Reste sind hier aus Gründen der Übersichtlichkeit ebenfalls blau eingefärbt.

3.2.6.6 Titration des IP mit der T1-Domäne

Um auch die an der Wechselwirkung von IP und T1Domäne beteiligten Aminosäuren des IP zu identifizieren, wurde eine entsprechend ^{15}N markierte Probe des IP-Konstrukts, die von der AG Prof. Fakler, Freiburg, zur Verfügung gestellt wurde, mit dem T1K Konstrukt titriert. Zur Schonung der Probe wurde die Titration bei 283K durchgeführt.

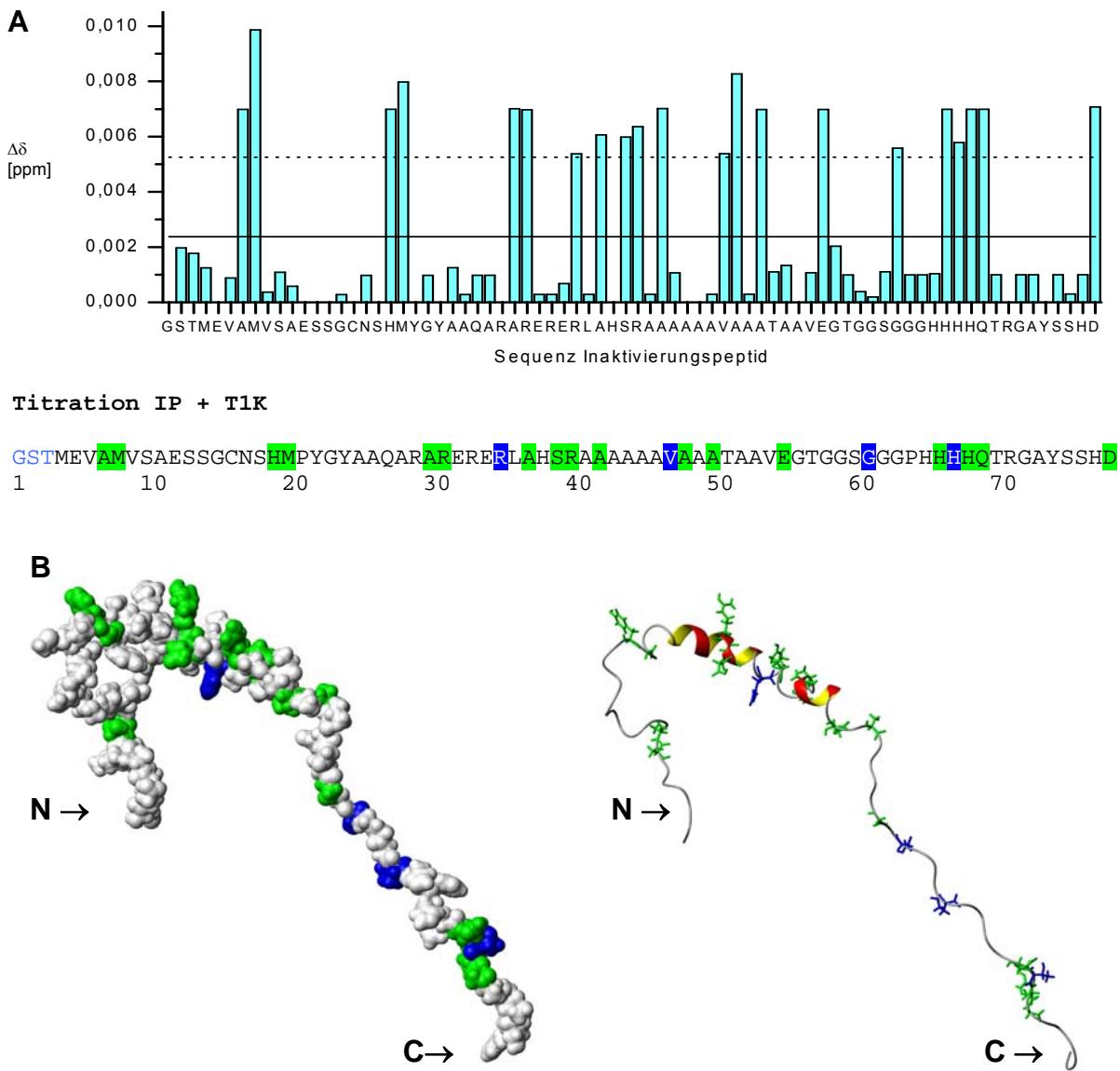


Abb. 3.24: Ergebnisse der Titration des IP mit dem T1K Konstrukt **(A)** Säulendiagramm der Verschiebungen aufgetragen gegen die Sequenz des IP. Die Signale haben eine geringere Linienbreite, sind damit schärfer und heben sich deutlich vom Rauschen ab. Mittelwert (MW) (—) und die Summe von MW und Standardabweichung (····) sind entsprechend markiert. (Bei den graphisch nicht dargestellten Signalen wurde keine Veränderung beobachtet) Darunter die bewertete Darstellung der Aminosäurereste des IP, die bei der Titration mit dem T1K Konstrukt Veränderungen der chemischen Verschiebung aufweisen. Deutliche Verschiebungen sind blau, starke grün markiert entsprechend der Definition unter 3.2.6.2. **(B)** Darstellung der Signalverschiebungen am Strukturmodell (MolMolTM). Die abgebildete Struktur ist Teil des von Wissmann et al. veröffentlichten Strukturbündels (PDB 1KN7, Wissmann 2003). Die meisten Wechselwirkungen zeigen sich in den helikalen Bereichen des Konstrukts zwischen A30 und A50. In der übrigen Sequenz finden sich in Abständen von etwa 8 AS jeweils 2 benachbarende interagierende Reste.

Bei 2-fachem Überschuss des T1K-Konstrukts konnte keine weitere Veränderung der chemischen Verschiebungen beobachtet werden. Aufgrund der geringeren Linienbreiten der Signale des monomeren IP waren noch deutlich kleinere Veränderungen als beim T1K Konstrukt auswertbar, da die Signale deutlich vom Rauschen unterschieden werden konnten. Dazu wurden die gleichen Kriterien wie beim T1K Konstrukt angewandt. Eine ebenfalls durchgeführte Auswertung anhand der Intensität der Signale zeigte trotz geringerer Streuung der Werte keine Gruppe von Signalen die sich signifikant von den übrigen Signalen unterschied. Wie beim T1K Konstrukt war eine gleichmäßige Verteilung des Signalabfalls zu beobachten. Die eindeutigere Auswertung der Signalverschiebungen wurde daher bevorzugt, das Ergebnis ist in Abbildung 3.25 dargestellt. Die Wechselwirkungen treten offenbar gehäuft in den helikalen Bereichen des IP auf, besonders auffällig ist der Bereich von A30 bis E55, der der C-Terminalen Hälfte der ersten Helix und der gesamten zweiten Helix entspricht und sehr alaninreich ist. Zusätzlich sind drei Arginin- (R31, R35, R40) und ein Glutamatrest (E55) enthalten, die zweite α -Helix ist jedoch weitgehend hydrophob. Dieser zentrale Bereich der Wechselwirkung wird flankiert von zwei AS-Paaren in den ungefalteten Termini des Konstrukts, die entweder eher hydrophobe Reste oder Histidine enthalten. C-terminal zeigen weitere vier zusammenhängende Reste, H66 bis Q69, mindestens deutliche, meist starke Wechselwirkungen.

3.2.6.7 Titration mit dem C-Terminus-Konstrukt K_v1.4 C84

Analog zur Titration des T1K Konstrukts mit dem IP wurde auch eine Titration mit dem K_v1.4 C-Terminus-Konstrukt C84 durchgeführt. Die Titration wurde bei 293 K bis zum 4-fachen Überschuss des C84 Konstrukts geführt, wobei eine Sättigung beobachtet wurde.

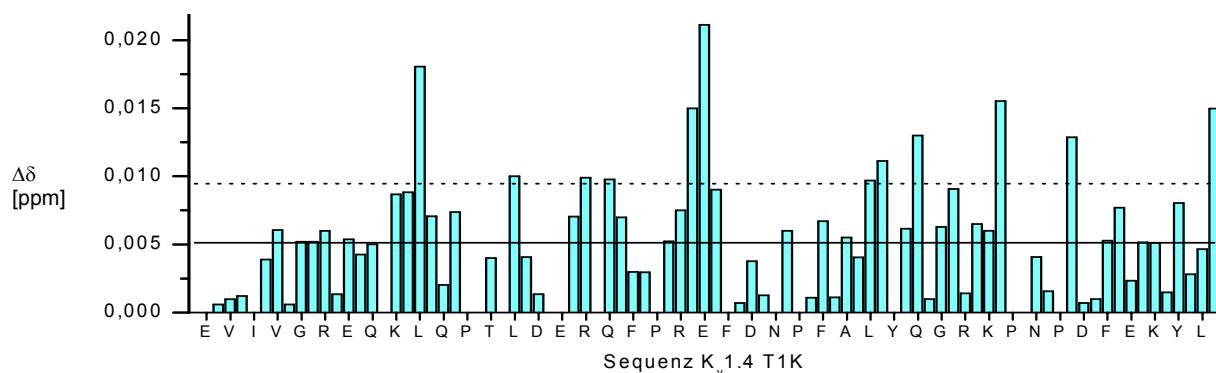


Abb. 3.25: Ergebnisse der Titration des T1K Konstrukts mit dem C84 Konstrukt. Säulendiagramm der Verschiebungen aufgetragen gegen die Sequenz des T1K Konstrukts. Mittelwert (MW) (—) und die Summe von MW und Standardabweichung (···) sind durch Linien markiert. Im Vergleich mit der Titration mit dem IP zeigt sich eine breitere Verteilung der wechselwirkenden Reste über die Sequenz, vor allem im N-terminalen Sequenzabschnitt (K18 bis A21) zeigen sich zuvor nicht beobachtete Wechselwirkungen.

Titration T1K mit C 84

MERVVINVSGLRFETQM**K**T**L**AQFPETL**G**D**P**E**K**R**T****Y**FDPLRN**Y**FFDRNRP**S**F**D**AI**L**YY**Q**SG**G**RL**K**R**P**V**N**V**P****F****D****I****F****T****E****E****V****K****F****Y****Q****I****C**
 1 10 20 30 40 50 60 70 80

Titration T1K mit IP

MERVVINVSGLRFETQM**K**T**L**AQFPETLL**G**D**P**E**K**R**T****Q****Y**F**D**PLRN**Y**FFDRNRP**S**F**D**AI**L**YY**Q**SG**G**RL**K**R**P**V**N**V**P****F****D****I****F****T****E****E****V****K****F****Y****Q****I****C**
 1 10 20 30 40 50 60 70 80

Abb. 3.26: Dargestellt sind die wechselwirkenden AS-Reste des K_v1.4 T1K Konstrukts mit dem C84 C-Terminus Konstrukt (obere Zeile) und zum Vergleich das Titrationsergebnis des Inaktivierungspeptids (unten). Deutlich wechselwirkende Reste sind blau, stark wechselwirkende Reste grün unterlegt. Grau unterlegte Reste zeigen mögliche, aber statistisch nicht abgesicherte Wechselwirkungen. Die Wechselwirkungen im N-terminalen Bereich sind deutlich stärker ausgeprägt als beim IP, im C-terminalen Bereich der Sequenz, der im Tetramer zur Membran orientiert ist, ist die Wechselwirkung nur bei einzelnen Resten stark ausgeprägt. Wieder ist erkennbar, dass auch die schwächeren Verschiebungen meist nicht statistisch verteilt sind, sondern in der Nachbarschaft der starken Wechselwirkungen auftreten.

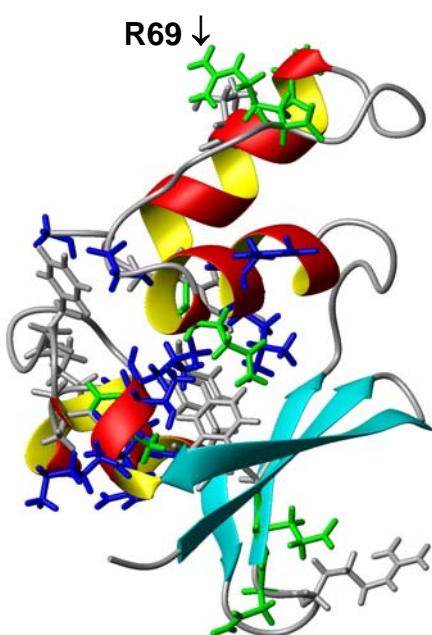
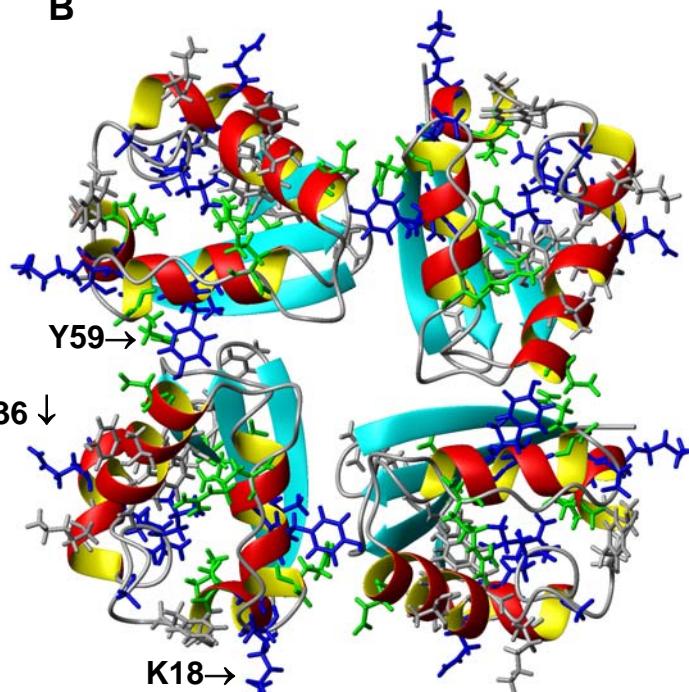
A**B**

Abb. 3.27: Darstellung der Ergebnisse der Titration des K_v1.4 T1K Konstrukts mit dem C-Terminus-Konstrukt C84 am Homologiemodell von T1K (MolMol™ Darstellungen). **(A)** Monomer als Ribbon-Modell. Der helikale C-terminale Abschnitt, der sich im Kanalkomplex in der Nähe der Zellmembran befindet, ist nach oben ausgerichtet, wichtige wechselwirkende Reste sind beschriftet. Auffällig ist, dass das zum Cytosol gewandte β-Faltblatt-Strukturelement kaum Wechselwirkungen zeigt.

(B) Aufsicht auf das Tetramer von der Membranseite aus gesehen. Die nach außen weisenden Reste Q36 und K18 sind gut erkennbar, im Zentrum des Tetramers finden sich im Gegensatz zur Titration mit dem IP kaum wechselwirkende Reste. Dafür sind auf der Außenseite in der mittleren Ebene des Konstrukts deutlich mehr wechselwirkende Reste zu erkennen. Die Farbcodierung entspricht Abb. 3.26: Deutlich wechselwirkende Reste sind blau, stark wechselwirkende Reste grün dargestellt. Grau unterlegte Reste weisen schwächere Wechselwirkungen auf.

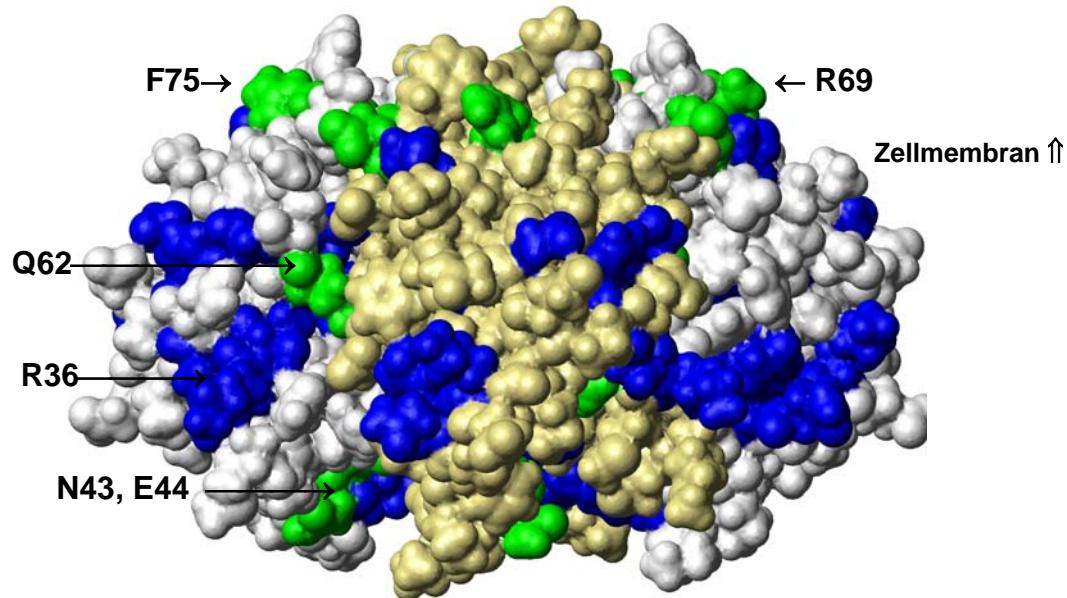


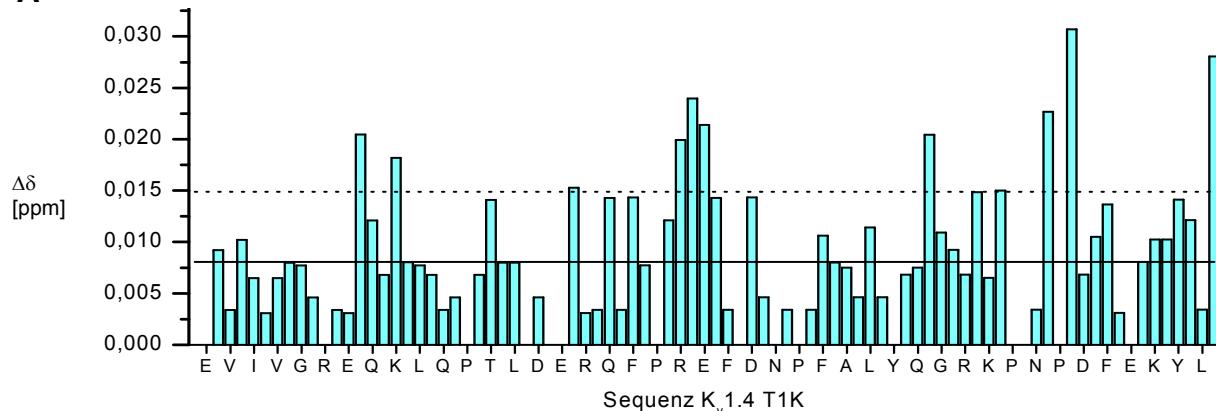
Abb. 3.28: Oberflächendarstellung des Tetramers, die Orientierung entspricht dem Monomer (A), die der Membran zugewandte Seite weist nach oben. Jeweils zwei Monomere wurden beigefarbig hervorgehoben. Viele der wechselwirkenden Reste ragen deutlich aus der Oberfläche hervor. Die meisten befinden sich, im Gegensatz zur Wechselwirkung mit dem IP, etwa in der mittleren Ebene des Tetramers. Stark wechselwirkende Reste sind grün eingefärbt. Im Oberflächenmodell sind die im sonst grau dargestellten, schwächer wechselwirkenden Reste wie die deutlich wechselwirkenden Reste blau dargestellt, um Übersichtlichkeit zu gewährleisten. An der Oberfläche gut erkennbare und z.T aus der Fläche herausragende Reste, die an den Wechselwirkungen beteiligt sind, sind entsprechend beschriftet. Besonders markant erscheinen die Reste um R36 und Q62 in der mittleren Ebene des Tetramers.

Wie in den Abbildungen 3.27 und 3.28 erkennbar, stehen die mit dem C84 Konstrukt wechselwirkenden Reste vor allem in der mittleren Ebene des T1K-Tetramers miteinander in Kontakt. Kontakte im Inneren des Komplexes konnten nicht festgestellt werden. Im Vergleich mit den Wechselwirkungen des IP (vgl. Abbildung 3.23) zeigte sich, dass die interagierenden AS-Reste wesentlich breiter über die Sequenz verteilt sind. Vor allem im Bereich von R39 bis E44 zeigt sich eine Überlappung der Interaktionsflächen. Im Bereich zwischen L58 und T79 sind weniger Wechselwirkungen erkennbar. Diese sind aber zum Teil wesentlich deutlicher ausgeprägt, in diesem Bereich zeigen sich in der Titration mit dem IP die meisten Wechselwirkungen.

Die Gegentitration des C84 Konstrukts mit der T1 Domäne (Meyer 2005) ergab mögliche Wechselwirkungen im Bereich der N-terminalen ersten 10 AS des C84 Konstrukts. Diese waren jedoch nur sehr schwach ausgeprägt im Vergleich mit der Interaktion des ETDV-Bindemotivs mit einer PDZ-Domäne.

3.2.6.8 Kombinierte Titration mit C-Terminus und Inaktivierungspeptid

Da die Bereiche der Interaktion des IP und des C84 Konstrukts mit der T1 Domäne eine teilweise Überlappung zeigten, lag es nahe mit Hilfe einer kombinierten Titration des T1K Konstrukts die Wechselwirkungen bei Anwesenheit beider Peptide zu untersuchen. Dazu wurde die Titrationsreihe, die zuvor bei 293 K bis zum 5,7-fachen Überschuss des IP geführt worden war, durch die Zugabe des C84 Konstrukts weitergeführt, bis auch das C84 Konstrukt im 5,7-fachen Überschuss gegenüber der T1K Monomer-Konzentration vorlag. Das Konzentrationsverhältnis von IP und C84 Konstrukt war also 1:1. Die Titration wurde bei 293 K durchgeführt, zur besseren Vergleichbarkeit mit der C84 Titration wurden einige Titrationsstufen zusätzlich bei 283 K vermessen. Der Temperaturunterschied hatte jedoch nur geringe Auswirkungen auf das Titrationsergebnis, so dass im Folgenden nur die Ergebnisse bei 293 K dargestellt sind. Durch die hohe Proteinkonzentration (ca. 6 mM Gesamtprotein) und damit erhöhte Viskosität der Probe nahm die Qualität der Spektren etwas ab, die Ergebnisse sind daher etwas anfälliger für Fehler, die durch Rauschen und Linienverbreiterung hervorgerufen werden. Vor Beginn der Titration wurde das in geringer Menge vorhandene Proteinpräzipitat aus der Probe entfernt. Der Verlust des T1K Konstrukts wurde anhand der aufgenommenen NMR-Spektren auf weniger als 10% der Ausgangsmenge geschätzt.

A**B**

Titration von T1K mit IP und C84



Abb. 3.29: (A) Ergebnisse der Titration des T1K Konstrukts mit dem IP und C84 Konstrukt. Säulendiagramm der Signalverschiebungen (Gesamtverschiebungen) aufgetragen gegen die Sequenz des T1K Konstrukts. Mittelwert (MW) (—) und die Summe von MW und Standardabweichung (···) sind durch Linien markiert. (B) Dargestellt sind die wechselwirkenden AS-Reste des K_v1.4 T1K Konstrukts bei gleichzeitiger Interaktion mit dem IP und C84 Konstrukt. Deutlich wechselwirkende Reste sind blau, stark wechselwirkende Reste grün unterlegt. Grau unterlegte Reste zeigen mögliche, weniger starke Wechselwirkungen.

Das Ergebnis der Titration zeigte deutliche Veränderungen der chemischen Verschiebungen auch bei Signalen, die zuvor bei der Titration mit dem C84 Konstrukt keine signifikanten Shifts gezeigt hatten. In den Abbildungen 3.29 und 3.30 ist das Ergebnis der Titration dargestellt. Aufgrund der zusätzlichen Verschiebungen bei zuvor nicht beteiligten Signalen vor allem am N-Terminus des T1K Konstrukts und im Bereich um D48, ist ein kooperativer Effekt der Peptide anzunehmen. Dafür spricht auch, dass sich Signale, deren Verschiebung sich bereits nach der IP-Titration im Bereich der Sättigung befunden hatten, also keine weitere Veränderung bei weiterer IP-Zugabe mehr zeigten (vgl. Abbildung 3.22), nach der Zugabe des C84 Konstrukts erneute Verschiebungen aufwiesen. Auch eine Verringerung bereits vorhandener Verschiebungen, die auf eine Verdrängung des IP durch das C84 Konstrukt hinweisen könnte, wurde beobachtet. Eine genauere Betrachtung der nachgewiesenen Veränderungen erfolgt im Rahmen der Diskussion der Ergebnisse.

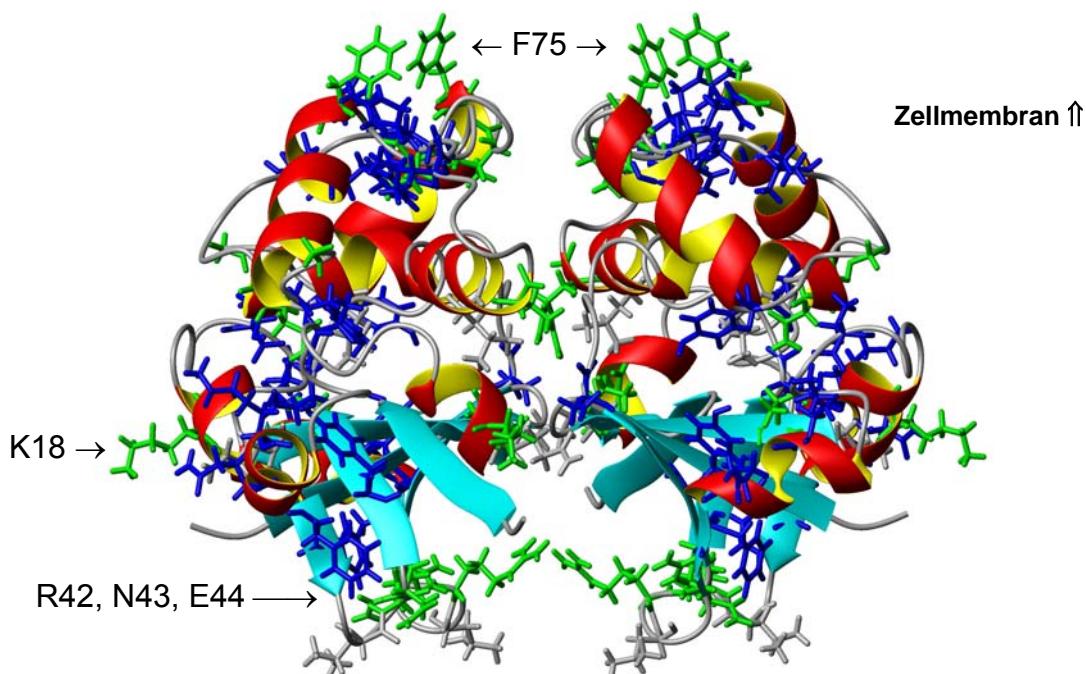


Abb. 3.30: Darstellung der Ergebnisse der kombinierten Titration von T1K mit IP und C84. (Ausgangsdaten vgl. Abb. 3.29 (B)). Dabei ist die zunächst detektierte Gesamtverschiebung der Signale zugrunde gelegt. Seitenansicht des T1K Tetramers im Ribbon-Modell (MolMolTM), die der Membran zugewandte Seite weist nach oben, sie wird von den C-terminalen helikalen Bereichen des Konstrukts gebildet. Viele der wechselwirkenden Reste ragen deutlich aus der Oberfläche hervor bzw. bilden zusammenhängende Wechselwirkungsbereiche die sich im Inneren des Tetramers fortsetzen. Reste mit starken Verschiebungen sind grün dargestellt, Reste mit deutlichen Verschiebungen blau und mit schwachen Verschiebungen grau eingefärbt. Dabei ist der Abschnitt von R42 bis E44, der als Loop aus dem zum Cytosol gewandten β -Faltblattelelement hervorragt besonders auffällig. Auch um F75 zeigt sich eine Anhäufung von räumlich zusammenliegenden deutlich wechselwirkenden Resten.

3.2.6.9 Zusammenfassung der Ergebnisse der Titrationsexperimente

Mit Hilfe der Titrationsexperimente konnte für die Wechselwirkung des K_v1.4 T1K Konstrukts mit dem Inaktivierungspeptid sowohl im N- als auch im C-terminalen Bereich des Konstrukts jeweils ein zusammenhängender Wechselwirkungsbereich identifiziert werden. Beide Bereiche sind durch eine unterbrochene Kette von Aminosäureresten verbunden, die ebenfalls Wechselwirkungen zeigen. Die identifizierten interagierenden Aminosäurereste an der C-terminalen, der Transmembrandomäne zugewandten Oberfläche des T1K Tetramers stehen auch über die Kontaktflächen der einzelnen Monomere im Inneren des Tetramers miteinander in Verbindung. Auch bei Resten, die nicht an der Oberfläche des Konstrukts liegen, zeigen sich hier deutliche Änderungen der chemischen Verschiebung. Beim Inaktivierungspeptid konnten ebenfalls, vor allem in den α -helikalen Bereichen zusammenhängende Sequenzabschnitte festgestellt werden, die mit dem T1K Konstrukt wechselwirken.

Die Wechselwirkungen mit dem C-terminalen C84 Konstrukt waren ebenfalls deutlich ausgeprägt. Sie sind vor allem in der mittleren Ebene des Tetramers zu finden und setzen sich an den seitlichen Flächen fort. Wurde das T1K Konstrukt nach Absättigung mit dem IP zusätzlich mit dem C84 Konstrukt titriert, so ergaben sich zusätzliche Veränderungen an mehr als der Hälfte der bereits verschobenen Signale, sowie zusätzliche neue Verschiebungen, die auf einen synergistischen Effekt der beiden Peptide hindeuten. Auch verminderte Signalverschiebungen wurden beobachtet. Diese offenbar komplexen Vorgänge werden bei der Diskussion der Ergebnisse detailliert betrachtet.

3.2.7 Weitere Experimente zur Interaktion des K_v1.4 T1K Konstrukts mit dem Inaktivierungspeptid und C-Terminus

Zur Bestätigung der bisherigen Ergebnisse bei der Titration des T1K Konstrukts wurde ein Batch-Bindungstest mit anschließendem Nachweis durch 1D NMR Spektren konzipiert. Dabei sollte die Bindung des IP an das mit dem 6xHis-Tag an eine Ni-NTA-Matrix gebundene T1K Konstrukt nachgewiesen werden, indem anschließend unter nativen Bedingungen mit EDTA eluiert wurde und 1D Spektren aufgenommen wurden. Bei erfolgter Bindung sollte so, da die 1D ¹H „Fingerprints“ aller Konstrukte bekannt waren, das zuvor gebundene IP festgestellt werden. Es stellte sich jedoch heraus, das das IP-Konstrukt, das eine seltene natürliche 4xHistidin-Sequenz besitzt, selbst nach vollständiger Vorsättigung der Ni-NTA Matrix mit dem T1K-Konstrukt einen sehr hohen Hintergrund erzeugte und so genaue Analysen unmöglich machte.

Auch durch Sättigungstransfer-Experimente konnte der Kontakt der Proteinkonstrukte nicht nachgewiesen werden.

3.3 Expression und Kristallisation der Kv1.3 T1 Domäne

Nach den guten Erfolgen bei der Untersuchung des Kv1.4 T1K Konstrukts der Ratte wurde angestrebt, ein ähnlich gut zu handhabendes Konstrukt der T1 Domäne des humanen spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.3 zu klonieren und zu charakterisieren. Die dazu notwendige cDNA stand über das RZPD (Berlin) zur Verfügung. Diese Arbeiten waren Gegenstand der Diplomarbeit von Andreas Winklmeier (Winklmeier 2005).

3.3.1 Das Kv1.3 T1K REE Konstrukt

Aufgrund der Erfahrungen mit den übrigen Kv Konstrukten wurden verschiedene Konstrukte kloniert und auf ihre Löslichkeit hin überprüft. Das Konstrukt Kv1.3 T1K REE zeigte die beste Löslichkeit. Es ist mit 105 AS um 17 AS länger als das Kv1.4 T1K Konstrukt und enthält daher auch die letzte, am wenigsten sequenzidentische α -Helix der T1 Domäne, die im T1K Konstrukt nicht enthalten ist. Wie das Kv1.4 T1K Konstrukt besitzt das Konstrukt einen 6xHis-Tag und ist im pET 20b+ Vektor (Novagen) kloniert. Die molare Masse des Konstrukts beträgt 14,32 kDa, der pI liegt bei 6.30. Als am besten geeigneter Puffer erwies sich erneut der KP_i Standardpuffer in einer Konzentration von 150 mM bei pH 6,5.

3.3.2 Kristallisation des Kv1.3 T1K REE Konstrukts

Nach der Aufnahme der ersten ¹⁵N TROSY-HSQC Spektren zeigte sich, dass die Auflösung der Spektren trotz makroskopisch guter Löslichkeit des Proteinkonstrukts deutlich schlechter war als die des Kv1.4 T1K Konstrukts, obwohl der Unterschied der molaren Masse mit ca. 2,3 kDa eher gering war. Auch das Verhältnis der Signalintensität zum Rauschen der Messung war wesentlich schlechter als bei den Spektren von Kv1.4 T1K.

Um dieses Problem zu lösen, wurden zunächst weitere Puffertests durchgeführt. Eine Oxidation und damit einhergehende Aggregation war wegen fehlender Cysteine nicht anzunehmen. Als die Proben im NMR-Röhrchen nach ca. 4-wöchiger Lagerung bei 4 °C überprüft wurden, um die Haltbarkeit zu beurteilen, zeigte sich, dass die Wand des Glasröhrchens mit Kristallen besetzt war. In den folgenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass es sich um Kristalle des Kv1.3 T1K REE Konstrukts handelte. Versuche zur gezielten Kristallisation des Konstrukts zeigten, dass die Glasoberfläche des

NMR-Röhrchens offenbar als Keim für die Kristallisation des Konstrukts notwendig ist. Somit lagen erstmals Kristalle einer T1 Domäne unter den gleichen Pufferbedingungen wie bei den aufgenommenen NMR-Daten vor.



Abb. 3.31: Kristalle des K_v1.3 T1K REE Konstrukts (Lichtmikroskopische Aufnahme). Die Kristalle die bei 4 °C in 150 mM KP_i gewachsen sind, sind etwa 0,2 mm groß.

3.3.3. Vorläufige Ergebnisse zur Struktur der Kv1.3 T1 Domäne

Um zu klären, ob die Kristalle sich für die Röntgenstrukturanalyse eigneten, wurden am Max Planck Institut für molekulare Physiologie (Prof. Dr. Wittinghofer) von Dr. Weyand Testmessungen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Kristalle die Raumgruppe I4 besaßen und ein gut aufgelöstes Röntgenbeugungsmuster zeigten, das allein für eine Struktur mit einer Auflösung von 1,5 Å ausreichen würde.

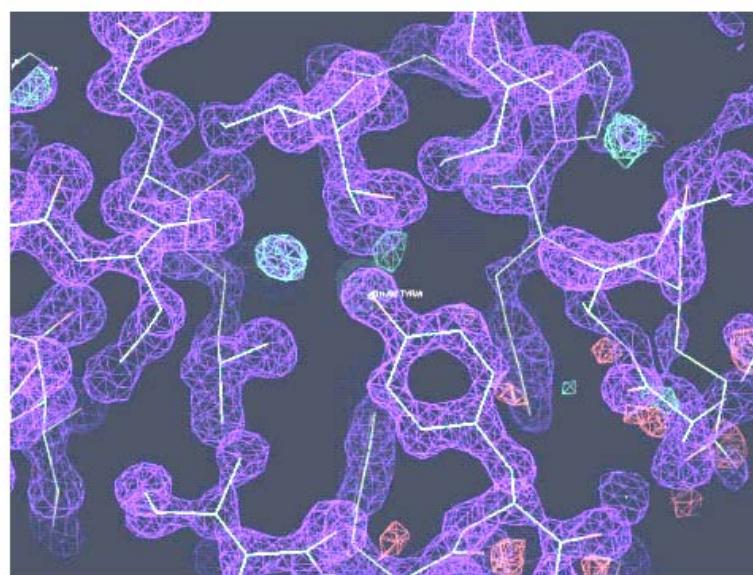


Abb. 3.32: Elektronendichtekarte des K_v1.3 T1K REE Konstrukts erstellt auf Basis der Röntgenbeugungsdaten im Molecular Replacement Verfahren. Zentral in der Mitte der Abbildung ist ein Tyrosinrest deutlich zu erkennen.

Durch weitere Messungen am Synchrotron des Paul Scherrer Instituts (Villigen, Schweiz) konnte ein noch besser aufgelöster Datensatz erhalten werden. Durch die kurzwelligere Synchrotronstrahlung war nun eine Auflösung von 1,2 Å möglich.

Weitere Messungen, deren Ergebnisse zum aktuellen Zeitpunkt jedoch noch nicht vorliegen. sind zur Lösung einer Struktur des Konstrukts mit einer Auflösung von 1,2 Å erforderlich.

4 Diskussion

Durch die in den zahlreichen NMR-Experimenten gewonnenen Daten konnten viele Informationen über die molekularen Grundlagen möglicher Interaktionen der cytosolischen Domänen des spannungsgesteuerten schnell inaktivierenden Kaliumkanals Kv1.4 mit den anderen cytosolischen Domänen des Kanalproteins gewonnen werden. Dabei konnten sowohl für den N-terminalen Sequenzabschnitt vor Beginn der T1 Domäne als auch für den C-Terminus des Kanalproteins Wechselwirkungen mit dem Tetramer der T1-Domäne gefunden werden. Aufgrund der spezifischen Eigenschaften der funktionell als Tetramer vorliegenden Kanalproteine ergaben sich jedoch einige spezielle Anforderungen hinsichtlich der angewandten Arbeitstechniken und der Auswahl der für die Untersuchungen geeigneten Kanalproteine.

4.1 Untersuchung der Kv3.4 T1-Domäne

Das Kv3.4 Kanalprotein erschien zunächst als das am besten geeignete Untersuchungsobjekt: Es besitzt ein in Lösung stabil gefaltetes Inaktivierungspeptid (Antz, Kalbitzer 1997) mit einem extrem kurzen Linker, welches eine direkte Interaktion des IP mit der T1-Domäne nahelegt. Der Kanal verfügt *in vivo* über die typische A-Typ Spannungscharakteristik eines schnell inaktivierenden Kaliumkanals, so dass von einer nachgewiesenen Funktionalität der schnellen Inaktivierung ausgegangen werden konnte. Aufgrund der strukturellen Eigenschaften der T1-Domäne erwiesen sich die untersuchten Konstrukte jedoch als problematisch.

4.1.1 Eigenschaften der T1-Domänen Konstrukte und ihre Auswirkung auf die Qualität der NMR Spektren

Die Löslichkeit der Kv3.4 Konstrukte bereitete zunächst große Probleme und konnte erst durch die Anpassung der Konstruktänge und systematische Pufferscreenings zumindest in zufriedenstellendem Maße erreicht werden. Für die Ermittlung des geeigneten pH-Wertes erwies sich der theoretische isoelektrische Punkt nur bedingt geeignet. Er ermöglicht zwar eine Einschätzung, bei welchem pH-Wert die Summe der Ladungen des Konstrukts Null ist, bezieht sich aber auf das ungefaltete Protein. Bei gefalteten Proteinen konnte dieser Punkt, an dem das Protein meist nur schlecht löslich ist, deutlich abweichen. Damit war eine gezielte Planung der Konstrukte auf dieser Basis kaum möglich, die Orientierung an bekannten Strukturen homologer Proteine und an Sekundärstrukturvorhersagen führte zu

besseren Ergebnissen, z.B. wenn Sekundärstrukturelemente bei der Verkürzung der Konstrukte erhalten blieben.

Auch weitere strukturelle Informationen wurden einbezogen, besonders die Charakterisierung der Zinkbindestelle des im Bereich der T1 Domäne der *nicht-shaker* Kanäle (Bixby, Choe 1999). Durch die Notwendigkeit einer funktionellen Zinkbindung waren die Konstrukte nicht weiter verkürzbar ohne die Stabilität des Tetramers und damit der *in vivo* zu erwartenden Konformation des Proteins zu beeinträchtigen. Aus dem gleichen Grund erschien es wenig sinnvoll, die im Konstrukt enthaltenen 7 Cysteine durch Serine zu ersetzen. Selbst dieser konservative Austausch würde die Funktionalität des Zinkbindemechanismus, an dem pro Interaktionsfläche drei Cysteinreste beteiligt sind, stark beeinträchtigen. Von der Einführung der entsprechenden Mutationen wurde daher abgesehen. Durch die EDTA-Experimente war bereits bekannt, dass die Ausschaltung zweiwertiger Ionen Aggregationen eher begünstigt als verhindert. Würden die beobachteten Aggregationen durch den 6xHis-Tag verursacht, so wäre genau der umgekehrte Effekt zu beobachten, da es über zweiwertige Ionen zur Komplexbildung zweier His-Tags kommen kann.

Auch bei allen Experimenten mit den Kv1.4 T1K und Kv1.3 T1K REE Konstrukten konnte keine Beteiligung des 6xHis-Tags an Aggregationen oder sonstigen Protein-Protein Interaktionen festgestellt werden.

Die Zusammensetzung der Puffer, in denen zumindest das Kv3.4 165H Konstrukt gut löslich war, wirft zumindest im Bezug auf den verwendeten TDZ Puffer Fragen auf. Nur in diesem Bereich, idealerweise bei pH 9,0 zeigte das Konstrukt ausreichende Stabilität als Tetramer obwohl der Puffer keinerlei Kaliumionen enthielt und das Chloridanion (der Puffer enthält 150 mM NaCl) bei allen anderen Konstrukten eher Salting out Effekte bewirkt hatte. Allein die Ionenstärke des Puffers liegt mit ca. 170 mM in etwa im Bereich der anderen Konstrukte. Dieses untypische Verhalten des Konstruktts, verglichen mit den Pufferbedingungen für alle Kv1.4 Konstrukte, die mit 150 mM KPi bei pH 6,5 *in vitro* Bedingungen benötigen, die denen *in vivo* beobachteten sehr ähnlich sind (vgl. 4.2.1), könnte darauf hinweisen, dass bei den Konstrukten weiterer Optimierungsbedarf besteht.

Eine weitere mögliche Ursache für das eher untypische Verhalten dieses Konstrukttes des Kv3.4 Kanalproteins ist, dass die *shaw-ähnlichen* Kaliumkanalproteine der Kv3 Kanalunterfamilie im Bereich des T1-S1 Linkers über einen selbst in der Unterfamilie wenig konservierten Einschub verfügen, der bei Kv3.4 mit ca. 40 AS Länge besonders ausgeprägt ist. Das Ende des 165 H Konstruktts ragt etwa 15 AS weit in diesen Bereich hinein, der allerdings viele saure Reste enthält und daher aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften die Löslichkeit des Konstruktts fördern könnte. Dementsprechend zeigte die Verkürzung des Konstruktts auf 153 AS eine Verschlechterung seiner Löslichkeit. Aufgrund dieser

Konstellation ist es schwierig, die bei den Löslichkeitsscreens der K_v1.4 Konstrukte gewonnenen Erkenntnisse auf das K_v3.4 Konstrukt zu übertragen.

Eine weitere mögliche Ursache für den instabilen Zustand des Konstrukts in Lösung ist, dass in der K_v3.4 T1 Domäne nach dem ersten α-helikalen Sekundärstrukturelement ein weiterer etwa 20 AS langer glycin- und serinreicher Einschub vorhanden ist, der ausschließlich in der K_v3.4 Sequenz vorkommt. Dieser im bereits während der Diplomarbeit erstellten Homologiemodell (Schreier 2002) mangels Informationen über die Sekundärstruktur als großer, aus der T1 Domäne herausragender Loop erscheinende Sequenzabschnitt, könnte die Struktur der T1 Domäne destabilisieren und ist vermutlich nur schwer zuzuordnen, wenn der Versuch eines sequentiellen Assignments unternommen würde.

Da die Löslichkeitseigenschaften der vorhandenen Konstrukte nicht besonders geeignet für die Aufnahme von NMR-Spektren waren, deren Auflösung eine sequentielle Zuordnung ermöglichen würde, wurden die Arbeiten mit dem Konstrukt vorläufig eingestellt. Allerdings konnten an den Konstrukten wertvolle Erfahrungen in der effizienten Aufreinigung und Rückfaltung der T1-Tetramere gewonnen werden, die die weiteren Arbeiten wesentlich erleichterten. Die entwickelte Rückfaltapparatur ermöglichte die Rückfaltung auch oxidationsempfindlicher Konstrukte mit deutlich verminderten Puffervolumina, was bei den für die später durchgeführten Titrationen erforderlichen Proteinpräparationen zu erheblicher Kosten- und Zeitersparnis führte und eine gleichmäßig hohe Qualität der Proben sicherstellte.

4.2 Untersuchung der cytosolischen K_v1.4 Konstrukte und ihrer Wechselwirkungen

4.2.1 Zuschnitt der Konstrukte und ihre Lösungseigenschaften

Die bereits vorhandenen bzw. klonierten Konstrukte des shaker-ähnlichen spannungsgesteuerten Kaliumkanals K_v1.4 wiesen, obwohl die Klonierungen unabhängig voneinander durchgeführt wurden, erstaunlich ähnliche Lösungsbedingungen auf. Alle Konstrukte benötigten 150 mM Kaliumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,5. Das K_v1.4 IP Konstrukt und das C84 Konstrukt enthalten einen bzw. drei Cysteinreste, die den Zusatz von DTE erfordern. Aggregationen der Proteine konnten so zuverlässig verhindert und stabile Proteinproben für den Einsatz in der NMR-Spektroskopie erhalten werden.

Das K_v1.4 T1K Konstrukt (Auer 2002) ist in seinem Aufbau etwas einfacher als das zuvor betrachtete K_v3.4 165H Konstrukt. Der zusätzliche Loop tritt in der K_v1 Unterfamilie der Kaliumkanäle nicht auf und das Konstrukt ist soweit verkürzt, dass es keine Aminosäuren der

T1-S1 Linkerregion mehr enthält. Obwohl bei der Verkürzung auch ein möglicherweise helikaler C-terminaler Sequenzabschnitt entfernt wurde, konnte ein stabiles, gut lösliches Tetramer erhalten werden. Betrachtet man die Ergebnisse der analytischen und präparativen Größenausschlusschromatographie sowie der durchgeführten Diffusionsmessungen, so kann selbst bei lediglich qualitativer Auswertung durch Vergleich mit den eingesetzten Standardproteinen mit Sicherheit von einem Tetramer ausgegangen werden. Die Gelfiltration zeigt auch, dass zumindest makroskopisch kein Gleichgewichtszustand mit dem Monomer oder höheren Aggregaten besteht. Das Gleichgewicht der Tetramerisierung liegt also unter den gewählten Messbedingungen vollständig auf der Seite des Tetramers, dessen Stabilität unter denaturierenden und Hochsalzbedingungen untersucht wurde. Dabei zeigte sich das K_v1.4 T1K Tetramer auch bei hohen K⁺ Konzentrationen bis über 1 M stabil, eine Denaturierung konnte nur bei Zusatz von Guanidin entsprechend der Bedingungen der Rückfaltung erreicht werden, ein Zwischenzustand, also ein gelöstes, gefaltetes Monomer war unter allen getesteten Bedingungen nicht existent.

Unter Berücksichtigung der Annahme, dass sich Kaliumkanalproteine bereits falten und zu tetramerisieren beginnen, bevor sie das Ribosom verlassen haben (Kosolapov & Deutsch 2003), erscheint dies durchaus plausibel. Hierin liegt wahrscheinlich auch der Schlüssel zu dem nach der heterologen Expression notwendigen, vergleichsweise aufwändigen, Rückfaltverfahren: Da das mammale K_v1.4 T1K Konstrukt mit Hilfe der *E. coli* eigenen, prokaryotischen Ribosomen exprimiert wird, ist vermutlich schon hier die Proteinfaltung gestört. Die in großer Menge exprimierten, fehlgefalteten Proteine, werden von den Bakterien in Einschlusskörperchen abgelagert und können nur nach ihrer Denaturierung kontrolliert zurückgefaltet werden. Dass die Rückfaltung in guter Ausbeute nur dann gelingt, wenn im Bereich der kritischen GdmHCl Konzentration zwischen 1,3 M und 0,7 M diese nur sehr langsam verringert wird, ist so gut erklärbar. Da Faltung und Tetramerisierung vermutlich synchron ablaufen, führt ein zu schneller Entzug des denaturierenden Agens zu einer Stabilisierung fehlgefalteter Proteine, die bei vollständiger Entfernung des GdmHCl aggregieren und für weitere Beobachtungen unbrauchbar sind.

Bei den IP und C84 Konstrukten konnte die Rückfaltung deutlich schneller erfolgen, da hier keine Ausbildung einer so komplexen Quartärstruktur erfolgen musste. Die Konstrukte wurden denaturierend aufgereinigt, da auf diesem Wege bessere Ausbeuten als in der nativen Aufreinigung erhalten werden konnten und zeitsparend gearbeitet werden konnte, so dass Oxidationsprobleme vermieden wurden. Das von der Arbeitsgruppe von Prof. Fakler zur Verfügung gestellte Konstrukt des IP war zuvor nativ unter Einsatz verschiedener Puffer wie z.B. Tris aufgereinigt, und unter sauren Bedingungen vermessen worden (Wissmann 2003). Es erwies sich jedoch auch unter den für das K_v1.4 T1K Konstrukt ermittelten Lösungsbedingungen in Kaliumphosphatpuffer als gut löslich. Das Löslichkeitsscreening für

das C84 Konstrukt des K_v1.4 C-Terminus ergab ebenfalls die beste Löslichkeit im 150 mM KP_i bei pH 6,5. Betrachtet man die typischerweise im Cytosol vorliegenden Pufferbedingungen (vgl. Tabelle 1.1), so ist die Ähnlichkeit zu den gefundenen Lösungsbedingungen der Proteinkonstrukte sowohl im Bezug auf die Ionenstärke als auch die Art der vorliegenden Ionen unverkennbar. Im Gegensatz zu den K_v3.4 Konstrukten kann also von einem, den Bedingungen *in vivo* sehr ähnlichen System gesprochen werden.

Beim Vergleich mit dem T1 Domänenkonstrukt von K_v1.3 zeigt sich, dass auch dieses Konstrukt und andere K_v1.3 Konstrukte (Winklmeier 2005) die gleichen oder sehr ähnliche Pufferbedingungen benötigen.

4.2.2 Voraussetzungen für die Durchführung der NMR-Experimente

Nachdem die aufgenommenen NMR-Testspektren (¹H ¹⁵N TROSY- sowie NOESY-Spektren) nicht perdeuterierter Proben des tetrameren K_v1.4 T1K Konstrukts keine Hinweise auf unkontrollierte Aggregation mehr zeigten, aber die Linienvbreiterung durch die mit 48,4 kDa recht große Masse des Konstrukts eine Zuordnung nur über 2D Spektren nicht zuließ, wurde auf perdeuteriertes Protein zurückgegriffen. So konnte die Anzahl der Signale im Spektrum reduziert werden. Da sämtliche Proben des K_v1.4T1K Konstrukts perdeuteriert hergestellt werden mussten, war ein Recyclingsystem für das eingesetzte D₂O erforderlich um die Kosten für die Proben, die zusätzlich noch mit ¹⁵N und teilweise auch mit ¹³C markiert werden mussten, in wirtschaftlichen Grenzen zu halten. Durch die erfolgreiche Entwicklung eines solchen Recyclingsystems, welches so konzipiert ist, dass möglichst wenig H₂O oder Protonen in das D₂O eingebracht werden, konnten nun die erforderlichen Proben des T1K Tetramers hergestellt werden.

Die sequentielle Zuordnung des K_v1.4 IP Konstrukts war bekannt, musste aber aufgrund der veränderten Messbedingungen erneut abgeglichen werden. Es zeigten sich nur geringe Veränderungen, die vor allem die Signale der direkt in der Sequenz aufeinanderfolgenden Histidinreste H65 bis H68 betrafen. Diese hatten sich aufgrund der Deprotonierung durch die Änderung des pH-Wertes von 4,4 auf 6,5 in der Protonenebene verschoben und waren nicht mehr eindeutig zuzuordnen. Für die Auswertung der Titrationsversuche stellte dies jedoch nur ein minimales Problem dar, da es sich um direkt benachbarte Reste handelte, die fast alle eine Wechselwirkung mit dem T1K Konstrukt zeigten. Somit war eine Unterscheidung nicht mehr zwingend notwendig.

4.2.3. Erstellung und Überprüfung der sequentiellen Zuordnung

Die korrekte sequentielle Zuordnung des tetrameren T1K Konstrukts war die Grundlage für die Auswertung der folgenden Titrationsexperimente, sie wurde daher mit besonderer Sorgfalt durchgeführt und mehrfach überprüft. Aufgrund der durch die Größe des Tetramers notwendigen Perdeuterierung waren in den aufgenommenen Spektren nur Signale von H^N Protonen vorhanden, die gegen die wässrige Pufferlösung austauschen konnten. Damit lagen in allen nicht austauschenden Positionen Deuteronen vor. Der Vorteil der verbesserten Auflösung der Spektren geht zulasten fehlender NOE und Seitenkettensignale. Damit ist eine sichere Zuordnung zunächst erschwert und erfordert besondere Sorgfalt.

Die zunächst erstellte erste Zuordnung, nur basierend auf den Informationen aus TROSY-HNCA und TROSY-HN(CO)CA Spektren perdeuterierter ¹⁵N- und ¹³C-markierter Proben, wies zwar kaum Widersprüche, aber dafür viele mehrdeutige Möglichkeiten der Zuordnung auf. Schließlich konnten durch Einsatz eines TROSY-HN(CO)CACB Spektrums neben den bereits bekannten C^a Daten auch Daten der chemischen Verschiebung für die C^β Atome erfasst werden. Da hier ebenso, wie für die C^a Shifts, umfangreiche Vergleichsdaten (IUPAC 1999) zur Verfügung stehen, konnte die Zuordnung nun überprüft und abgesichert werden. Dabei wurden etwa 30% der Zuordnungen korrigiert bzw. neu gefunden. Die nun erhaltene Zuordnung wies keine Mehrdeutigkeiten mehr auf. Die noch fehlenden Signale waren als Konstruktanfang bzw. Prolin-Nachfolger zu schwach, um sicher vom Hintergrundrauschen unterscheidbar zu sein, oder waren wegen vermutlicher Überlagerung gleichartiger Signale nicht einzeln identifizierbar. Seitenkettensignale konnten mit Hilfe der C^a und C^β Daten identifiziert und zuverlässig ausgesondert werden. Insgesamt ist die Zuordnung des Konstrukts ohne die 6xHis-Tag und Linkersequenz zu 95% vollständig.

Der Vergleich der Abweichung der chemischen Verschiebung der C^a Atome mit den Durchschnittswerten in der *random coil* Konformation ergab mit der Information über die Sekundärstruktur des T1K Konstrukts eine Kontrollmöglichkeit durch den Vergleich mit homologen Proteinen. Auch hier konnte die Zuordnung bestätigt und damit abgesichert werden. Nach Fertigstellung der Zuordnung wurde diese mit der derzeit einzigen verfügbaren Zuordnung einer K_v1 T1 Domäne verglichen, der T1 Domäne der aK_v1.1 Kanals der Seeschnecke *Aplysia californica* (Baker et al. 2006). Trotz der im Vergleich mit den Säugetier-Kanälen der K_v1 Kanalfamilie deutlich geringeren Sequenzidentität mit K_v1.4, zeigten sich beim Vergleich der Peaklisten in den Bereichen mit identischer Sequenz erstaunlich genaue Übereinstimmungen der Werte der chemischen Verschiebungen, was sich auch in der visuellen Ähnlichkeit der erhaltenen TROSY-HSQC „Fingerprint“ Spektren ausdrückte. Unter Berücksichtigung aller vorhandenen Informationen kann die erhaltene sequentielle Zuordnung des K_v1.4 T1K Tetramers als sicher gelten.

4.2.4 Titrationsexperimente

Die durchgeführten Titrationsexperimente erbrachten bei der ersten Auswertung nach der Volumenveränderung der Signale nur äußerst ungenaue Ergebnisse. Bei der Auswertung der Änderungen der chemischen Verschiebung erschienen die erhaltenen Werte zunächst sehr klein, zumal bei der Berechnung der $\Delta\delta$ -Werte für die ^{15}N Shifts der Gewichtungsfaktor 0,1 verwendet wurde. Bei den zuerst ausgewerteten Testmessungen war die digitale Auflösung in der ^{15}N -Dimension durch eine relativ geringe Anzahl der Inkremente eher gering und die dadurch auftretenden sprunghaften Änderungen der Verschiebungsbeträge sollten so eine geringere Gewichtung erhalten. Diese Fehlerquelle wurde bei den für diese Arbeit ausgewerteten Messungen vermieden, indem besser aufgelöste TROSY-Spektren aufgenommen wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten wurde der Gewichtungsfaktor in der Auswertung nicht verändert.

Da speziell die immer wieder geöffneten Titrationsproben vor allem bei oxidationsempfindlichen Proteinen nur begrenzt haltbar sind, musste ein Kompromiss zwischen der maximalen Auflösung und der maximalen Anzahl an Titrationsschritten gefunden werden. Nachdem die relativ hohe Stabilität der Proben bekannt war, wurde bevorzugt mit hoher Auflösung gemessen, um möglichst sichere Daten zu erhalten. Für eine exakte kleinschrittige Titrationsreihe, wie sie zur Untersuchung der Bindungskinetik benötigt wird, sind möglicherweise mehrere Proben notwendig, die aus einer Proteincharge hergestellt und aliquotiert werden sollten.

Weiterhin werden bei der Aufnahme eines ^2H editierten TROSY-HSQC Spektrums nur die Signale der H^N Protonen detektiert, eine hier beobachtete Änderung der chemischen Verschiebung repräsentiert also die Veränderungen an der Protein Hauptkette. Die direkte Beobachtung der Reste dürfte deutlich größere Verschiebungen zeigen.

4.2.4.1 Interaktion des T1K Konstrukts mit dem Inaktivierungspeptid

In der Titration des T1K-Tetramers mit dem IP konnte am T1K Konstrukt ein zusammenhängender wechselwirkender Bereich auf der Membran und damit auch der Pore zugewandten Seite des Tetramers festgestellt werden. Ein wesentlich kleinerer Bereich befindet sich an der N-terminalen, dem Cytosol zugewandten Seite des Konstrukts. Es handelt sich hierbei um einen aus der Ebene des N-terminalen β -Faltblattelements hervorragenden Loop, der mehrere geladene Reste trägt und in fast allen durchgeföhrten Titrationen Wechselwirkungen zeigte. Daher wurde zunächst angezweifelt, dass es sich bei dieser Wechselwirkung um eine spezifische Wechselwirkung handelte. Erst die Auswertung der Kinetik der IP-Bindung zeigt, trotz der noch wenig detaillierten Messung, dass mit E44

mindestens einer der Reste ein Bindungsverhalten zeigt, dass mit dem der am stärksten wechselwirkenden Aminosäure R69 im membranzugewandten C-terminalen Bereich des Konstrukts identisch ist. Auch die jeweils benachbarten Aminosäuren zeigen ähnliche Dissoziationskonstanten, so dass eher von einem gemeinsamen Bindungsmechanismus als von zwei getrennten Mechanismen auszugehen ist. Bei gleichzeitigem Vorliegen der IP-Bindung an einer Bindungsstelle und einer weiteren Interaktion an anderer Stelle, wäre ein unterschiedliches Bindungsverhalten der jeweiligen Bindungsstellen zu erwarten.

Eine Beteiligung des Polyhistidin-Tags des T1K Konstrukts und damit verbundene Artefakte können ausgeschlossen werden, in diesem Bereich der Sequenz wurden keinerlei Shift-Änderungen festgestellt.

Die relativ geringen Shift-Beträge, die oft nur im Bereich der Summe von Mittelwert und Standardabweichung der Shifts lagen, waren trotzdem deutlich vom Rauschen der Messung unterscheidbar, das den Betrag des Mittelwertes aller Shifts nicht übertraf. Shifts, deren Betrag größer war als die Summe von Mittelwert und der Hälfte der Standardabweichung wurden daher als signifikant betrachtet und in die Auswertung mit einbezogen. Auch bei der Betrachtung der Wechselwirkungsstellen am Homologiemodell wird deutlich, dass zusammenhängende Bereiche der Wechselwirkung bestehen, während andere Bereiche, vor allem die N-terminale Fläche des β -Faltblatts völlig unbeteiligt sind und keine Wechselwirkungen zeigen. Wären durch Rauschen verursachte Shifts mit ausgewertet worden, müsste eine statistische Verteilung der Interaktionsstellen auftreten. Dies ist eindeutig nicht der Fall.

4.2.4.2 Interaktion des Inaktivierungspeptids mit dem T1K Konstrukt

Die Auswertung der Titration des IP mit dem T1K Konstrukt gestaltete sich etwas einfacher, da die Signale des deutlich kleineren und monomeren IP Konstrukts eine deutlich schmalere Linienbreite und höhere Signalintensität aufweisen. Das Hintergrundrauschen dieser Messung war daher deutlich niedriger.

Die festgestellten Wechselwirkungsbereiche konzentrieren sich vor allem in den helikalen Bereichen des IP, also dort, wo die freie Beweglichkeit der Reste in der Polypeptidkette eingeschränkt ist und die aus der α -Helix herausragenden Reste stabiler positioniert sind als in einer gestreckten- oder *random coil* Konformation. Die in den ungefalteten Sequenzabschnitten beobachteten Wechselwirkungen treten meist paarweise auf, sind also nicht statistisch verteilt. Eine weitere Häufung von Wechselwirkungen tritt im Bereich der nativen 4xHistidin-Sequenz (H65-68) auf. Zwar ist hier die Übertragung der Zuordnung nicht völlig abgesichert, da aber nur Vertauschungen innerhalb dieser vier Histidinreste möglich sind, muss trotzdem von einer signifikanten Wechselwirkung ausgegangen werden.

4.2.4.3 Modell zur Interaktion von T1-Domäne und Inaktivierungspeptid

Mit Hilfe des Programms MolMolTM konnte aufgrund der Titrationsergebnisse ein Modell erstellt werden, dass eine räumliche Vorstellung der Interaktion der Tetramerisierungsdomäne mit dem IP vermittelt. Dazu wurde das IP Konstrukt manuell unter Berücksichtigung der Informationen aus den Titrationsexperimenten auf das Homologiemodell des T1K Tetramers gefittet. Schon bei den ersten Versuchen zeigte sich, daß viele Strukturen des von Wissmann et al. (Wissmann 2003, PDB 1KN7) veröffentlichten Strukturbündels bereits die richtige Passform für eine seitliche Bindung an das Tetramer, entlang der identifizierten Interaktionsstellen besaßen.

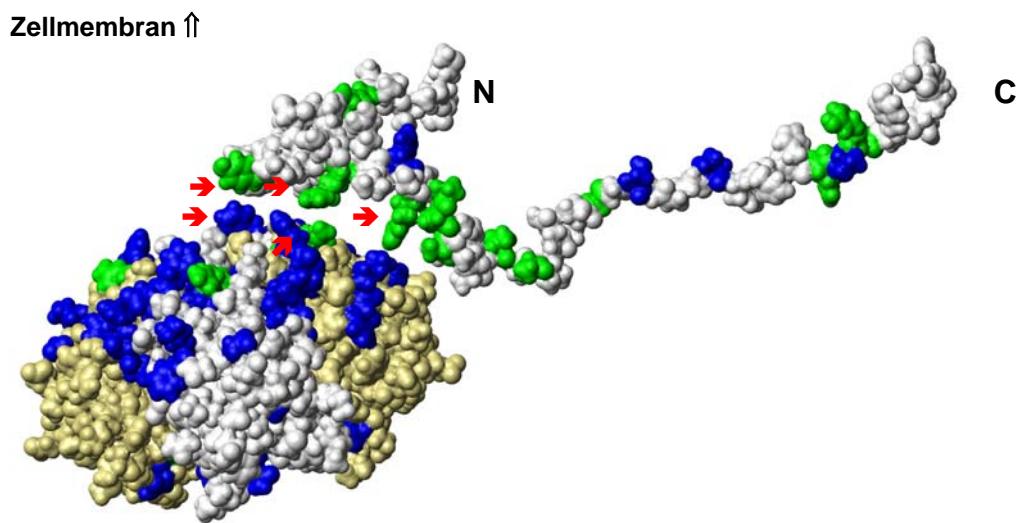


Abb. 4.1: Modell der Interaktion von T1-Domäne und Inaktivierungspeptid bei Kv1.4. Beim T1K Tetramer (links) sind zwei Monomere farbig abgesetzt (beige). N- und C-Terminus des IP (rechts) sind entsprechend markiert. Reste die eine Interaktion zeigen, sind blau dargestellt, solche mit starken Interaktionen grün eingefärbt. Die roten Pfeile markieren große hydrophobe Seitenketten, die vermutlich zur Bindung des IP beitragen.

Darüber hinaus waren die räumlichen Abstände der Interaktionsstellen des IP denen des T1K Konstrukts sehr ähnlich. Die räumlich am besten passende der möglichen Strukturen wurde ausgewählt und auch im Bezug auf vorhandene Ladungen und hydrophobe Bereiche entsprechend ausgerichtet. Dabei wurde die vermutlich spezifischere Interaktionsstelle des IP am C-Terminus des T1K-Konstrukts stärker berücksichtigt als die N-terminalen, weniger zusammenhängenden Interaktionsflächen. Es zeigte sich, dass die hydrophobe zweite (C-terminale) α-Helix sich gut an der C-terminalen Interaktionsfläche einpasst und vor allem über große hydrophobe Seitenketten wie Phenylalanin- und Tyrosinreste interagiert. Bei genauer Betrachtung ist die entsprechende parallele Anordnung der Reste bereits in diesem einfachen Bindungsmodell erkennbar. Das Modell des IP deckt in der Aufsicht die farbig

markierten interagierenden Reste des T1K Tetramers ab. Der vermutlich an anderer Stelle bindende äußerste N-terminus des IP bleibt frei beweglich.

Aufgrund der räumlichen Anordnung erscheint auch eine Interaktion des 4xHis Motivs des IP an die N-terminale Bindestelle des T1K Konstrukts, die mit dem E44 Rest eine negative Ladung trägt möglich.

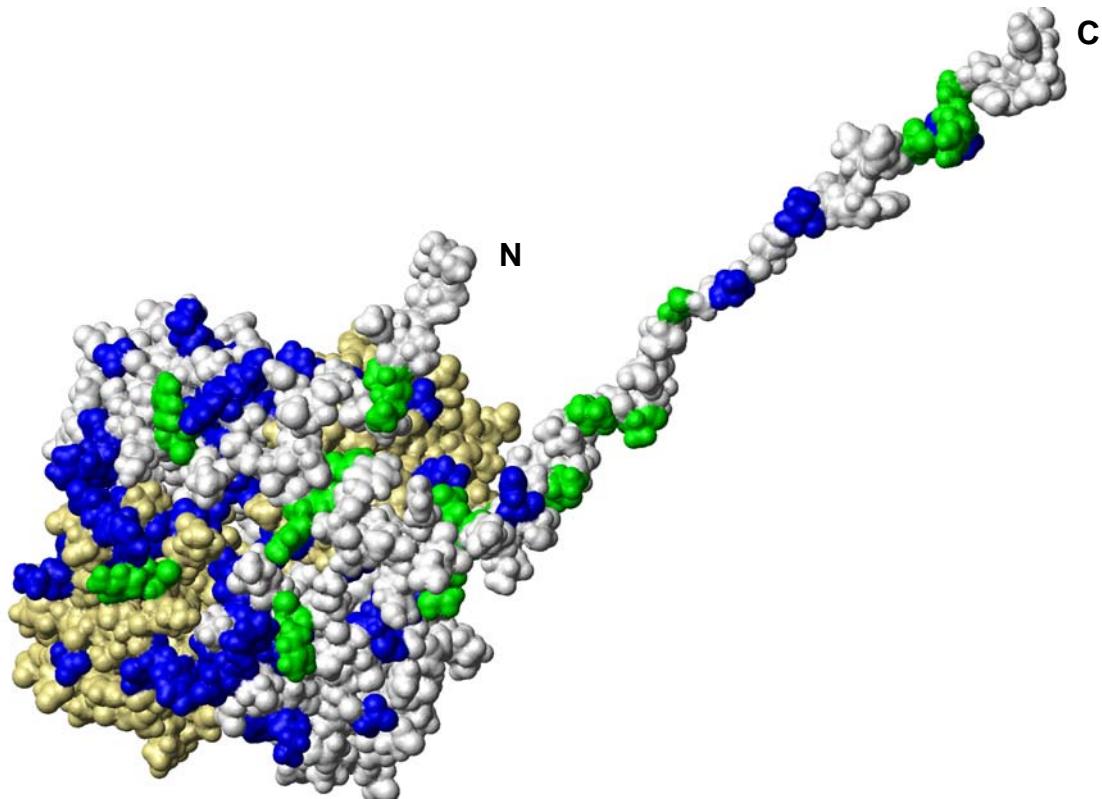


Abb. 4.2: Aufsicht auf das Interaktionsmodell von der Membranseite aus gesehen, Farbgebung und Markierung sind identisch mit Abb. 4.1. Die Interaktionsfläche auf der der Membran zugewandten Seite des T1K Tetramers ist vollständig durch das IP abgedeckt. Die vom Tetramer abgewandte Seite des IP zeigt fast keine Wechselwirkungen.

In der Aufsicht auf das Modell wird noch deutlicher, dass der helikale Bereich des IP mit seinen Interaktionsstellen die Bindestelle auf der der Pore zugewandten Oberfläche des Tetramers fast vollständig abdeckt, obwohl das Modell nur auf bestehenden Strukturen beruht und keine Flexibilität der Konstrukte zulässt. Mit den so vorliegenden Informationen erscheint der Einsatz eines Softwaremodells (wie z.B. HADDOCK) zur Verifizierung dieses Bindungsmodells sinnvoll.

Das erhaltene Bindungsmodell erscheint anhand zahlreicher Hinweise realistisch. Die ersten fünf Aminosäuren (MEVAM....) am N-Terminus des Konstrukts sind identisch mit denen des von Baker et al. (Baker, Wüthrich & Choe 2006) untersuchten Konstrukts des aK_v1.1 Kanals, der ebenfalls ein Inaktivierungspeptid besitzt. Die übrige IP- und Linkersequenz weist jedoch

große Unterschiede in Länge, Aminosäuresequenz und -zusammensetzung auf, während die folgenden T1-Domänen zu über 80% sequenzidentisch sind. Dies erklärt auch die bei K_v1.4 im Vergleich zu den Ergebnissen von Baker et al. unterschiedliche Bindestelle des Inaktivierungspeptids. Die T1 Domänen sind sehr ähnlich, interagieren aber mit verschiedenen Interaktionspartnern, so dass sich auch der Bindemechanismus der Peptide, sofern sie nicht direkt mit dem identischen N-Terminus binden, unterschiedlich sein muss. Auffällig ist auch, dass die wenigen veränderten Aminosäuren, die zwischen den T1 Domänen auftreten, im Bereich dieser Regionen der Wechselwirkung mit dem IP liegen (siehe auch Alignment im Anhang). Möglicherweise bieten diese Ergebnisse eine Erklärung für die komplexen Vorgänge bei der schnellen Inaktivierung der Kanäle. Der von Baker et al. postulierte Mechanismus einer Bindungsstelle an der T1 Domäne, die der Positionierung des Inaktivierungspeptids in der Nähe des Poreneingangs dient, erscheint beim K_v1.4 Kanalprotein mit seinem eher großen IP und sehr langen Linker durchaus vorstellbar. Orientiert man sich an der Kristallstruktur des K_v1.2 Kanalproteins (MacKinnon 2005a) (Abbildung 1.9 s.16) um einen Eindruck von der räumlichen Anordnung der T1 Domäne relativ zur Porenregion zu erhalten, erscheint eine solche Vorbindung und damit räumliche Fixierung des IP durchaus sinnvoll. Stellt man sich zusätzlich die in dieser Struktur nicht enthaltenen N- und C-terminalen Sequenzen (jeweils 4-fach) in direkter Nachbarschaft zum Kanalkplex vor, so ist zu vermuten, dass die Diffusion der N-termini stark eingeschränkt ist und auch eine zusätzlich Wechselwirkung mit den C-terminalen Sequenzabschnitten, wie sie z.B. bei Sankaranarayanan und Mathew (Sankaranarayanan 2005) postuliert wird, nicht ausgeschlossen werden kann.

4.2.4.4 Wechselwirkungen des T1K Konstrukts mit dem C-Terminus Konstrukt C84

Die Qualität der aufgenommenen Daten und die Auswertung entsprach der der Titration von K_v1.4 T1K mit dem Inaktivierungspeptid und wird hier daher nicht mehr gesondert diskutiert. Auch hier konnten eindeutige Wechselwirkungen des Peptidkonstrukts mit der T1 Domäne nachgewiesen werden. Die festgestellten Wechselwirkungen mit dem C84 Konstrukt finden sich im Unterschied zur Wechselwirkung des IP vor allem in der mittleren Ebene des Tetramers und sind somit eher von der Membranoberfläche abgewandt. Allerdings treten auch im Bereich, der zuvor Wechselwirkungen mit dem IP zeigte, Überlappungen auf, besonders auffällig ist das bei den AS R69 und E44, die an der Wechselwirkung mit beiden Peptiden beteiligt sind. Für die Wechselwirkung am C84 Konstrukt liegen zwar Hinweise vor, dass vor allem die ersten 10 AS des Konstrukts beteiligt sind (Meyer 2006), ein exakter Nachweis der beteiligten Reste konnte aber noch nicht geführt werden. Dies scheint

plausibel, da der äußerste C-Terminus des Konstrukts mit dem ETDV-Motiv eine Wechselwirkung mit der zweiten PDZ-Domäne von PSD-95 (Meyer 2006; Kim & Sheng 1995) eingeht, und dazu aus dem Kanalkomplex herausragen sollte. Der Kontakt mit der T1 Domäne erfolgt also in einem Bereich, in dem sich das C-terminale Ende des Kanalproteins, zwischen dem Ende der S6-Helix an der Membranoberfläche und der möglichen Bindung des Gerüstprotein im cytosolischen Bereich, seitlich an die T1-Domäne anlagern könnte. Im Gegensatz dazu ist beim Inaktivierungspeptid zu beobachten, dass eine Anlagerung vor allem an der zur Membran gewandten Seite erfolgt, die möglicherweise eine Positionierung des N-Terminus des IP zur Folge hat.

4.2.4.5 Interaktion der T1 Domäne mit dem Inaktivierungspeptid und C-Terminus

Die kombinierte Titration des T1K Konstrukts mit dem Inaktivierungspeptid und dem C84 Konstrukt wurde durchgeführt, um Informationen über einen möglichen Einfluss des ungefalteten C-terminalen Peptids auf die Bindung des IP und damit die schnelle Inaktivierung des Kanals zu erhalten. Eine solche Wechselwirkung wurde zwar bereits 1990 für den *Shaker* Kanal aus *Drosophila melanogaster* diskutiert (Iverson & Rudy 1990), diese These aber erst in den letzten Jahren von verschiedenen Autoren wieder aufgegriffen. So konnten für den Kv2.1 Kanal gezeigt werden, dass die Mutation zweier Reste des C-Terminus die Inaktivierungskinetik des Kanalproteins beeinflusste (Ju et al. 2003). Von besonderem Interesse war hier jedoch die Arbeit von Sankaranarayanan et al. (Sankaranarayanan et al. 2005). Hier führte eine vekürzte C-terminale Domäne des humanen Kv1.4 Kanalproteins in elektrophysiologischen Experimenten zu einer deutlichen Verlangsamung der Inaktivierungskinetik des Kanalproteins, ohne jedoch Ionenselektivität oder Spannungsabhängigkeit des Kanals zu verändern, so dass eine Wechselwirkung des C-Terminus mit dem IP anzunehmen war.

Um die bei der Zugabe des C84 Konstrukts beobachteten Veränderungen der Shifts besser beurteilen zu können, wurden diese zunächst mit den zuvor einzeln bestimmten Wechselwirkungen der jeweiligen Konstrukte verglichen. Dabei wurde sowohl der Anstieg als auch die Abnahme der Intensität der Interaktion dargestellt (Abbildung 4.3).

Titration T1K mit IP (Einzelexperiment)

MERVVINSGLRFETQM**KTLAQFPETLLGDPEKRTQYFDPLRN**EYFFDRNRP**SFDAILYQQSGGRLKRPVNVPFDIFTEEVKFYQLG**

Veränderung der Interaktion

MERVVINSGLRFETQM**KTLAQFPETLLGDPEKRTQYFDPLRN**EYFFDRNRP**SFDAILYQQSGGRLKRPVNVPFDIFTEEVKFYQLG**

Titration (T1K und IP) mit C84

MERVVINSGLRFETQM**KTLAQFPETLLGDPEKRTQYFDPLRN**EYFFDRNRP**SFDAILYQQSGGRLKRPVNVPFDIFTEEVKFYQLG**

Veränderung der Interaktion

MERVVINSGLRFETQM**KTLAQFPETLLGDPEKRTQYFDPLRN**EYFFDRNRP**SFDAILYQQSGGRLKRPVNVPFDIFTEEVKFYQLG**

Titration T1K mit C84 (Einzelexperiment)

MERVVINSGLRFETQM**KTLAQFPETLLGDPEKRTQYFDPLRN**EYFFDRNRP**SFDAILYQQSGGRLKRPVNVPFDIFTEEVKFYQLG**

1 10 20 30 40 50 60 70 80

Wechselwirkungen(Titration): **stark** **deutlich** **schwach** Änderung: **Zunahme** **Abnahme**

Abb. 4.3: Darstellung der Wechselwirkungen des T1K Konstrukts mit dem IP bzw. C84 Konstrukt. Die Zugabe des C84 Konstrukts erfolgte nachdem die Sättigung mit dem IP erreicht war. Die obere und untere Zeile repräsentieren die Ergebnisse der Titrationen mit dem Inaktivierungspeptid und dem C-Terminus Konstrukt, in der Mitte ist das Ergebnis der kombinierten Titration mit IP und C84 Konstrukt. Die eingeschobenen rot-gelb markierten Zeilen geben die Veränderung der kombinierten Titration gegenüber den Einzeltitrationen an. Eine rote Markierung repräsentiert die Zunahme, eine gelbe Markierung die Abnahme der Intensität der Wechselwirkung.

In der vergleichenden Darstellung zeigt sich, dass vor allem im N-terminalen Bindungsbereich eine Zunahme der Interaktionen zu beobachten ist. Im C-terminalen Bereich des Konstrukt, der die Wechselwirkungen mit dem IP zeigt, ist zu beobachten, dass bei verschiedenen Resten sowohl Zunahme als auch Abnahme der Intensität der Interaktion erfolgt. Insgesamt ist vor allem auffällig, dass neue Wechselwirkungen auftreten, die bei keiner der Einzeltitrationen registriert wurden. Vor allem im Bereich von T15 bis K18 treten neue, starke Wechselwirkungen auf. Auch das Signal von R42 zeigt eine deutliche Zunahme und ist als starke Wechselwirkung eingestuft. Daneben findet sich im Bereich zwischen diesen zwei auffälligen Regionen eine Reihe neuer, deutlicher Wechselwirkungen sowie verstärkter Interaktionen. Insgesamt ist also ein synergistischer Effekt zu beobachten, die zusätzliche Bindung des C84 Konstrukt an den T1K-IP Komplex (oder möglicherweise auch die Verdrängung des IP aus der Bindung) führt zu einer Veränderung des Interaktionsmusters der T1 Domäne. Damit kann eine Wechselwirkung von Inaktivierungspeptid und C-Terminus bei der Bindung an die T1-Domäne bestätigt werden. Der genaue Mechanismus dieser Interaktion sollte aber noch in Titrationen, in denen Reihenfolge der Zugabe und Startkonzentration des bereits vorliegenden Interaktionspartners variiert werden, genauer analysiert werden. Eine Verdrängung des IP aus der Bindung wäre z.B. durch die direkte Beobachtung des IP mittels ¹⁵N Markierung und die Verwendung unmarkierter Interaktionspartner nachweisbar.

Unter Einbeziehung der Ergebnisse von Sankaranarayanan et al. liegt die Vermutung nahe, dass das vollständige C-terminale Peptid offenbar zu einer mindestens teilweisen Verdrängung des Inaktivierungspeptids aus der Bindung an der T1 Domäne führt, das nun freier bewegliche IP sorgt für eine schnellere Inaktivierung des Kanalproteins.

Eine verstärkte Bindung und somit bessere Positionierung des IP durch die zusätzliche Bindung des C-terminus ist aber ebenfalls vorstellbar. Die vorliegenden Ergebnisse bieten also einen Einstieg zum Verständnis der komplexen Interaktionen der cytosolischen Domänen spannungsgesteuerter Kaliumkanäle und ihrer Regulation.

4.3 Perspektiven für die NMR-spektroskopische Untersuchung der K_v Kanalkonstrukte.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ergeben sich eine Reihe von Perspektiven und Ansätze für weitere Untersuchungen der cytosolischen Domänen der K_v Kanalfamilie und ihrer Wechselwirkungen, besonders unter dem Aspekt der schnellen Inaktivierung, die selbst innerhalb dieser Kanalfamilie eine Besonderheit in der Funktionalität darstellt und ein möglicher Ansatz zum genaueren Verständnis der physiologischen Kanalfunktion ist.

4.3.1 Mögliche Perspektiven für das K_v3.4 Konstrukt

Aufgrund der während der Arbeit mit dem K_v1.4 Konstrukt optimierten Methoden zur Herstellung ¹⁵N-, ¹³C- und ²H- markierter Proteine für die NMR könnte ein erneuter Versuch einer sequentiellen Zuordnung des Konstrukts unternommen werden, dies setzt jedoch eine hohe Zahl von Inkrementen und Scans zur Optimierung der technischen Auflösung der Spektren, sowie den Einsatz eines 800 MHz NMR-Spektrometers voraus. Da die Probe aufgrund der enthaltenen, nicht entfernbaren Cysteine oxidationsempfindlich ist, könnte die notwendige lange Aufnahmezeit für die Spektren zur Proteinaggregation beitragen. Die Durchführung einer Titrationsreihe mit einem IP Konstrukt erscheint unter diesen Bedingungen relativ schwierig, ist aber möglicherweise durchführbar, sofern unter Sauerstoffabschluss gearbeitet wird.

Allerdings ist dazu die Klonierung eines gut löslichen Konstrukts erforderlich, das kein Ballpeptid trägt. Das K_v 3.4 IP, das mit Linker nur etwa 35 AS lang ist, steht als synthetisches Peptid zur Verfügung (Antz, Kalbitzer 1997) könnte aber auch mit Hilfe eines Fusionsproteins heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse mit dem K_v1.4 Konstrukt und den Daten von Baker et. al (Baker 2006) ist anzunehmen, dass eine spezifische Bindestelle nachgewiesen werden kann. Auch die mit 143 AS, verglichen mit den

K_v1 Kanälen, sehr lange C-terminale Domäne des $K_v3.4$ Kanals stellt einen weiteren Ansatzpunkt für Titrationsexperimente dar. Die so klonierten Konstrukte der cytosolischen Domänen können auch für Vergleichstitrationen des $K_v1.4$ T1K eingesetzt werden. Speziell das $K_v3.4$ IP, das nachweislich gefaltet vorliegt und zum $K_v1.4$ IP nur geringe Homologie aufweist, stellt hier eine interessante Möglichkeit dar, die Spezifität der Interaktionen von T1-Domänen und IP's zu untersuchen.

4.3.2 Weitere Arbeiten mit den Konstrukten des $K_v1.4$ Kanalproteins

4.3.2.1 Weiterführung und Optimierung der Titrationen und ihrer Auswertung

Zur besseren Beurteilung der Kinetik der Bindung des IP an das $K_v1.4$ T1K Konstrukt ist die Aufnahme einer weiteren Titrationsreihe erforderlich, die angesichts der bestimmten vorläufigen Bindungskonstanten vor allem im Bereich bis zum etwa 2-fachen molaren Überschuss des IP über das Monomer des T1K Konstrukts deutlich mehr Messpunkte aufweisen sollte. Auch die maximale IP-Konzentration sollte höher angesetzt werden, damit eine Sättigung oder auch eine mögliche komplexere Bindungskinetik besser beobachtet und vor allem ausgewertet werden kann. Dabei sollte, um die Auflösung der Spektren zu verbessern, ein 800 MHz NMR-Spektrometer mit Cryoprobenkopf eingesetzt werden. Eine weitere Verbesserung der Auflösung kann durch mehr Inkremente bei der Aufnahme der Spektren erreicht werden, dies gilt ebenfalls für eine höhere Anzahl der Scans. Beide Maßnahmen führen aber auch zu einer Verlängerung der Meßzeit, so dass eine Abwägung erfolgen muss. Die Haltbarkeit der Proben stellte bislang kein Problem dar, obwohl z.B. die Aufnahme einer Titrationsreihe insgesamt 10 Tage dauern konnte, bei einer weiteren Verlängerung der Aufnahmezeiten könnten Aggregationen durch die Oxidation von Cysteinen auftreten.

Ist der Sättigungsbereich sicher festgestellt, könnten Einzelmessungen oder Titrationen mit wenigen Schritten eingesetzt werden, um die bisher gefundenen Interaktionsstellen noch genauer zu charakterisieren und besser gegen das Rauschen der Messung abzugrenzen. Ähnliche Messungen könnten auch mit dem C84 Konstrukt und in der kombinierten Titration mit beiden cytosolischen Peptiden durchgeführt werden. Eventuell ist es ebenfalls sinnvoll mit einem solchen, zunächst groben Raster zu überprüfen, ob IP und C84 Konstrukt untereinander eine Interaktion zeigen.

4.3.2.2 Bestimmung einer NMR-Lösungsstruktur

Um anstelle des auf einer Kristallstruktur (Minor, Berger 2000; PDB 1QDV) beruhenden Homologiemodells des T1K Konstrukts die echte Lösungsstruktur der K_v1.4 T1 Domäne für die Auswertung der Interaktionsstudien einsetzen zu können, müssen neben der vorliegenden sequentiellen Zuordnung der Proteinhauptkette des Konstrukts noch weitere Informationen für die NMR-Strukturrechnung gewonnen werden. Durch die Aufnahme geeigneter TOCSY-Spektren können zunächst die Seitenkettenatome des T1K Konstrukts zugeordnet werden. Mit NOESY Spektren können zusätzlich Wechselwirkungen räumlich benachbarter Aminosäurereste bestimmt werden. Mit den so erhaltenen Informationen kann eine Proteinstruktur des Komplexes berechnet werden. Aufgrund der symmetrischen Anordnung der Monomere im Tetramer sollte es ebenfalls möglich sein, die an der Tetramerisierung beteiligten Reste zu bestimmen. Die vorliegenden Wasserstoffbrücken innerhalb des T1K Tetramers könnten eventuell ebenfalls mit Hilfe der NMR nachgewiesen werden.

Insgesamt bietet die Berechnung einer solchen Struktur aus den NMR-Daten viele interessante Möglichkeiten, um zu einem besseren Verständnis der Funktion der T1 Domänen *in vivo* zu gelangen. Auch in der Kristallstruktur möglicherweise fixierte oder nicht auflösbare flexible Regionen (z.B. zum Cytosol weisende Loops die nach den bisherigen Ergebnissen der Titrationen an den Interaktionen der T1-Domäne beteiligt sind) können in der NMR-Struktur aufgelöst und als flexibel erkannt werden.

4.3.2.3 Verknüpfung der gewonnenen Daten mit den elektrophysiologischen Eigenschaften der K_v Kaliumkanalproteine

Mit den vorhanden Ergebnissen der Titrationsexperimente wäre es bereits möglich, erstmals gezielt Mutationen in der T1-Domäne oder dem IP einzuführen, und gezielt ihre Auswirkungen zu beobachten. Das „Durchmutieren“ langer Sequenzabschnitte oder Austesten einer großen Anzahl möglicherweise wechselwirkender Reste, die durch ihre Lage oder Art der AS in Frage kommen könnten, entfällt. Daher könnte neben der molekularen Betrachtung in der NMR Spektroskopie, bei der gezielt beobachtet werden kann, ob die eingeführte Mutation Auswirkungen auf die Bindung des IP- oder C-Terminus hat, bei positivem Ergebnis auch die elektrophysiologische Untersuchung des funktionellen Kanalkomplexes angewandt werden. Da jetzt wenige gezielte Mutationen im Kanalprotein eingesetzt werden können, verringert sich der Arbeitsaufwand für solche Messungen im Gegensatz zu systematischen Screenings erheblich, da wesentlich weniger Konstrukte in Oocyten oder geeigneten Zelllinien exprimiert und vermessen werden müssen.

4.4 K_v1.3 Ergebnisse und Perspektiven

Die bisherigen Ergebnisse zum K_v1.3 T1K REE Konstrukt sind ebenfalls vielversprechend. Mit den gewonnenen Röntgenbeugungsdaten sollte die Erstellung einer Kristallstruktur mit sehr guter Auflösung möglich sein. Dabei muss auch überprüft werden, ob die als Grundlage für das Molecular replacement Verfahren genutzte K_v1.2 Struktur (Minor, Berger 2000; PDB 1QDV) die dafür am besten geeignete Struktur ist. Da zur Zeit neben der Proteinstruktur noch Bereiche mit hoher Elektronendichte vorhanden sind, die weder durch Wassermoleküle noch durch andere bekannte Zusätze im Kristallisationsansatz zufriedenstellend erklärt werden können, ist eine weitere Überprüfung der Kristallstruktur erforderlich. Da unter den gegebenen Pufferbedingungen zuvor noch keine Kristallstrukturen von K_v1 Kanal T1 Domänen bestimmt wurden, sind kleinere Abweichungen von den bekannten Strukturen möglich. Diese könnten zum Beispiel durch Konformationsänderungen bedingt durch den pH-Wert oder die Ionenstärke des im Kristallisatonsansatz verwendeten Puffers, aber auch durch dessen Bestandteile direkt verursacht werden.

Aufgrund der geringen Sequenzunterschiede der T1 Domänen von K_v1.3 und K_v1.4 (s. Alignments im Anhang) ist dann erstmals der Vergleich eng verwandter Röntgenkristall- und NMR-Strukturen möglich. Eine interessante Option ist auch, analog zum K_v1.3 T1K REE Konstrukt ein K_v1.4 Konstrukt zu klonieren und für die Kristallisation einzusetzen, ein direkter Vergleich von Kristall- und NMR-Struktur wäre dann ebenfalls möglich.

NMR-Untersuchungen und Kristallisation mit den gleichen Konstrukten durchzuführen erscheint aufgrund der Erfahrungen mit den K_v1.3 Konstrukten (Winklmeier 2005) und den übrigen K_v T1 Konstrukten sehr schwierig, da eine beginnende Kristallisation der Probe, wie bei K_v1.3 T1K REE beobachtet, zu einer erheblichen Verschlechterung der Qualität der Spektren führt.

5 Zusammenfassung

Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle erfüllen wichtige Funktionen in Zentralnervensystem, Herz- und glatter Muskulatur sowie in sekretorischen Zellen. Der Mechanismus der schnellen Inaktivierung ist essentiell für die korrekte Weiterleitung von Aktionspotentialen. Der funktionelle Kanal liegt *in vivo* als Tetramer vor, bedingt durch die symmetrische Architektur der Kanalpore. Die cytosolische T1 Domäne stabilisiert den Kanalkomplex.

Während die Spannungssensorfunktion und das Selektivitätsfilter der Kanäle in der bereits gut untersuchten Transmembrandomäne lokalisiert sind, ist über den Einfluss der T1 Domäne auf die schnelle Inaktivierung wenig bekannt. Neben der nachgewiesenen Beteiligung des Inaktivierungspeptids wird auch ein Einfluss der oft ungefalteten, wenig konservierten C-terminalen Domäne diskutiert.

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktionen der T1 Domäne mit dem Inaktivierungspeptid und dem C-terminalen Abschnitt des Kanalproteins bei schnellinaktivierenden K_v Kanälen mit Hilfe der Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie unter möglichst nativen Lösungsbedingungen molekular zu untersuchen und die Interaktionsflächen der Proteine zu bestimmen.

Dazu wurden verschiedene T1-Domänen Konstrukte der schnellinaktivierenden $K_v1.4$ und $K_v3.4$ und des $K_v1.3$ Kanals, der nicht über ein funktionelles IP verfügt, auf ihre Eignung für die Untersuchungen überprüft und die Lösungseigenschaften genau charakterisiert. Das $K_v1.4$ Kanalprotein erwies sich als für die Untersuchungen am besten geeignet, da das $K_v1.4$ T1K Konstrukt ein stabiles T1 Domänen-Tetramer in 150 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 ausbildet. Auch die Konstrukte der möglichen Liganden waren unter diesen, den natürlichen cytosolischen Verhältnissen sehr ähnlichen Bedingungen stabil und gut löslich. Das $K_v1.3$ Konstrukt bildete in der gleichen Pufferlösung Proteinkristalle, die sich zur Bestimmung einer Röntgenstruktur eigneten.

Aufgrund der für NMR-Experimente relativ hohen Masse des Tetramers von 48,4 kDa wurden für die sequentielle Zuordnung der Proteinauptkette des $K_v1.4$ T1K Konstrukts die jeweiligen TROSY-Versionen dreidimensionaler heteronuklearer NMR-Spektren eingesetzt. Dabei konnte eine zu 95% vollständige, sichere Zuordnung des T1K Konstrukts erreicht werden. Die dazu benötigten perdeuterierten und ^{15}N - und ^{13}C -isotopenmarkierten Proteinproben konnten nach Optimierung der Expressions- und Rückfaltbedingungen mit sehr guter Ausbeute hergestellt werden. Ein neu entwickeltes Recyclingverfahren für das eingesetzte D_2O trug zur Minimierung der Kosten bei.

In den Titrationsreihen, die mit ^2H entkoppelten ^{15}N -TROSY-HSQC Spektren erfolgten, wurde jeweils die Änderung der chemischen Verschiebung der H^{N} -Signale der Hauptkette eines der Interaktionspartner bei Zugabe des jeweiligen Liganden bestimmt. Mit Hilfe der

bekannten Zuordnungen konnten so die interagierenden Aminosäurereste identifiziert werden.

Für das T1K Konstrukt konnte im C-terminalen, zur Membran weisenden Bereich eine zusammenhängende Interaktionsfläche bestimmt werden. Am stärksten interagiert hier R69, umgeben von mehreren großen hydrophoben Resten. Im N-terminalen Bereich konnten außer in der Schleife um E44 keine signifikanten Wechselwirkungen gefunden werden. Die Gegentitration, bei der das Inaktivierungspeptid beobachtet wurde, zeigte starke Wechselwirkungen die sich auf einer Seite der zwei stabilen α -helikalen Bereiche des Inaktivierungspeptids konzentrierten und reich an hydrophoben Resten waren. In der manuellen Überlagerung der Struktur des Inaktivierungspeptids mit dem Homologiemodell des T1K Konstrukts waren die unregelmäßig geformten Interaktionsflächen deckungsgleich. Aufgrund der räumlichen Nähe der hydrophoben Phenylalanin- und Tyrosinreste kann von einer hydrophoben Wechselwirkung ausgegangen werden. Die Interaktion der T1 Domäne mit dem Inaktivierungspeptid konnte damit bestätigt werden.

Auch für das Konstrukt des C-Terminus des Kv1.4 Kanalproteins konnte eine Interaktion mit dem T1 Tetramer nachgewiesen werden. Die Hauptfläche der Wechselwirkung liegt an der Seitenfläche des Tetramers und überlappt nur geringfügig mit der des Inaktivierungspeptids. Auffällig ist jedoch, dass beide Interaktionspartner auch mit der Schleife um E 44 interagieren.

Die Titration der T1 Domäne mit beiden Interaktionspartnern zeigt synergistische Effekte der N- und C-terminalen Peptide. Die Interaktion an der im Cytosol befindlichen E44 Schleife nahm in der Intensität deutlich zu, während bei den C-terminalen, zur Membran gewandten Interaktionen eine deutliche Abnahme zu beobachten war. Offenbar verdrängte der C-Terminus das Inaktivierungspeptid aus der Bindung.

Mit diesen Ergebnissen stehen nun erstmals molekulare Informationen über die Interaktionen der cytosolischen Domänen des Kv1.4 Kanals zur Verfügung. Sie können zusammen mit der jetzt möglichen Bestimmung einer NMR-Lösungsstruktur des Kv1.4 T1K Tetramers und der in Arbeit befindlichen Kv1.3 Kristallstruktur bei identischen Pufferbedingungen einen Einblick in die recht komplexen Abläufe der schnellen Inaktivierung bei Kv-Kanalproteinen geben. Da die Interaktion jetzt definierten Aminosäureresten zugeordnet werden kann, können nach Einführung gezielter Mutationen elektrophysiologische Messungen durchgeführt werden, die es erlauben, die beobachteten Wechselwirkungen mit der Kanalfunktion und -regulation zu verknüpfen.

6 Literaturverzeichnis:

Antz, C., Geyer, M., Fakler, B., Schott, M.K., Guy, H.R., Frank, R., Ruppersberg, J.P. & Kalbitzer, H.R. (1997) NMR structure of inactivation gates from mammalian voltage-dependent potassium channels. *Nature* **385** 272-275

Armstrong, C.M., Bezanilla, F. & Rojas, F. (1973) Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *J. Gen. Physiol.* **62** 375-391

Armstrong, C.M. & Bezanilla, F. (1977) Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J. Gen. Physiol.* **70** 567-590

Ashcroft, F.M. (2006) From molecule to malady. *Nature* **440** 440-447

Auer, A. (2002) Expression und Charakterisierung der T1-Domäne des spannungsabhängigen K⁺-Kanals Kv1.4 aus Rattus Rattus. *Diplomarbeit* Universität Regensburg.

Bagby, S., Tong, K.I., Liu, D., Alattia, J.R. & Ikura, M. (1997) The button test: a small scale method using microdialysis cells for assessing protein solubility at concentrations suitable for NMR. *J. Biomol. NMR* **10**, 279

Baker, K.A., Hilty, C., Peti, W., Prince, A., Pfaffinger, P.J., Wider, G., Wüthrich, K. & Choe, S. (2006) NMR-Derived Dynamic Aspects of N-Type Inactivation of a Kv Channel Suggest a Transient Interaction with the T1 Domain. *Biochemistry* **45**, 1663-1672

Beckh, S. & Pongs, O. (1990) Members of the RCK potassium channel family are differentially expressed in the rat nervous system. *The EMBO Journal* **9**: (3) 777-782

Beeton, C. & Chandy, G. (2005) Potassium Channels, Memory T Cells, and Multiple Sclerosis. *The Neuroscientist* **11** (6): 550-562.

Bentrop, D., Beyermann, M., Wissmann, R. & Fakler, B., (2001) NMR Structure of the 'Ball-and-chain' Domain of KCNMB2, the β₂-Subunit of Large Conductance Ca²⁺ -and Voltage-activated Potassium Channels. *The Journal of Biological Chemistry* **276** (45) 42116-42121.

Berneche, S. & Roux, B. (2001) Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *Nature* **414** 73-77

Bixby, K., Nanao, m. Shen, V., Kreusch, A., Bellamy, H., Pfaffinger, P. & Choe, S. (1999) Zn²⁺ mediated and molecular determinants of tetramerization in Kv channels. *Nature Structural Biology* **6** 38-43

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254

Brünger, A., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. & Warren, G.(1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica* **54**(5): 905-21

- Chenna, R., Sugawara, H., Koike,T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G. & Thompson, J. D.** (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* **31** (13):3497-500
- Choe, S.** (2002) Potassium Channel Structures. *Nature Rev. Neurosci.* **3** 115-121.
- Cuello, L.G., Cortez, D.M. & Perozo E.** (2004) Molecular architecture of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel in a lipid bilayer. *Science* **306**(5695): 491-5.
- Cushman, S.J., Nanao, M.H., Jahng, A.W., DeRubies, D., Choe, S. & Pfaffinger, P.J.** (2000) Voltage dependent activation of potassium channels is coupled to T1 domain structure. *Nat. Struct. Biol.* **7** 403-407
- Dong,H., Nilsson, L. & Kurland, C.G.,** (1996) Co-variation of tRNA abundance and codon usage in Escherichia coli at different growth rates. *J. Mol. Biol.* **260**, 649-663
- 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.
- Dubendorff, J.W. & Studier, F.W.** ,(1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promotor with lac repressor. *J. Mol. Biol.* **219**, 45-59
- Geyer, J.P.** (2003) NMR-spektroskopische Untersuchung der Wechselwirkung zwischen der Ran-Bindedomäne 2 aus RanBP2 und Ran. *Diplomarbeit* Universität Regensburg
- Geyer, M., Herrmann, C., Wohlgemuth, S., Wittinghofer, A. and Kalbitzer, H.R.,**(1997) Structure of the Ras-binding domain of RalGEF and implications for Ras binding and signalling. *Nat. Struct. Biol.* **4**(9), 694-699:
- Goldstein, S.A., Bockenhauer, D., O'Kelly, I. & Zilberberg, N.** (2001) Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nature Rev. Neurosci.* **2**, 175-184.
- Gronwald, W. & Kalbitzer, H.R.** (2004) Automated Structure Determination of Proteins by NMR Spectroscopy. *Prog. NMR Spectrosc.* **44**: 33-96.
- Gubitosi-Klug, R.A., Mancuso, D.J. & Gross, R.W.** (2005) The human Kv1.1 channel is palmitoylated, modulating voltage sensing: Identification of a palmitoylation consensus sequence. *PNAS* **102** (17) 5964-5968.
- Gu, C., Jan, Y.N. & Jan, L.Y.** (2003) A conserved domain in axonal targeting of Kv1 (Shaker) voltage-gated potassium channels. *Science* **301** 646-649
- Gulbis, J.M., Mann, S. & MacKinnon, R.** (1999) Structure of a voltage-dependent K⁺ channel beta subunit. *Cell* **97**:943-52
- Gulbis, J.M., Zhou, M., Mann, S. & MacKinnon, R.** (2000) Structure of the cytoplasmic beta subunit T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. *Science*. **289** 123-127.
- Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stühmer, W. & Wang, X.** (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacological Reviews* **57**, 473-508.

- Gutman, G.A., & Chandy, K.G.** (1993). Nomenclature for vertebrate voltage-gated K⁺ channels. *Seminars in Neuroscience* **5**, 101-106.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. & MacKinnon, R.** (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* **66** 1061-1067
- HGNC** (HUGO Gene Nomenclature Committee) (<http://www.gene.ucl.ac.uk>)
- Hille, B.** (2001) Ionic Channels of excitable Membranes, 3rd ed. Sunderland, MA, Sinauer
- Hochuli, E** (1989) Genetically designed affinity chromatography using a novel metal chelate absorbent *Biologically Active Molecules* 217-239:.
- Imamura, F., Maeda, S., Doi, T. & Fujiyoshi, Y** (2002) Ligand Binding of the Second PDZ Domain Regulates Clustering of PSD-95 with the Kv1.4 Potassium Channel. *The Journal of Biological Chemistry* **277** (5) 3640-3646.
- (IUPAC) Chemical Shifts of Amino Acid** Shifts (coil-, beta-, helix- und all-Wert) aus CAMRA Library. Stand 07.02.1995 und BioMagResBank. (Stand: 02.02.1999)
- Iverson, L. E. & Rudy, B.** (1990) The Role of Divergent Amino and Carboxyl Domains on the Inactivation Properties of Potassium Channels Derived from the *shaker* Gene of *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, **10**(9): 2903-2916
- Jahng, A.W., Srang, C., Kaiser, D., Pollard, T., Pfaffinger, P. & Choe, S.** (2002) Zinc Mediates Assembly of the T1 Domain of the Voltage-gated K Channel 4.2. *The Journal of Biological Chemistry* **277** (49) 47885-47890.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T. & MacKinnon, R.** (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423** 33-41.
- Ju, M., Stevens, L., Leadbitter, E. & Wray,D.**, (2003) The Roles of N- and C-terminal Determinants in the Activation of the Kv2.1 Potassium Channel. *The Journal of Biological Chemistry* **278** (15) 12769-12778
- Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y.N. & Sheng, M.** (1995) Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* **378** 85-88
- Kobertz, W.R. & Miller, C.** (1999) K⁺ channels lacking the 'tetramerization' domain: Implications for pore structure. *Nature Structural Biology* **6** (12) 1122-1125.
- Koradi, R., Billeter, M & Wüthrich, K.** (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graphics* **14**, 51-55
- Kosolapov, A. & Deutsch, C.** (2002) Folding of the Voltage-gated K⁺ Channel T1 Recognition Domain. *The Journal of Biological Chemistry* **276** (6) 4305-4313
- Kosolapov, A., Tu, L.W., Wang, J. & Deutsch, C.** (2004) Structure Acquisition of the T1 Domain of Kv1.3 during Biogenesis. *Neuron* **44** 295-307
- Kreusch, A., Pfaffinger, P.J., Stevens, C.F. & Choe, S.** (1998) Crystal Structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* **392** 945-948.

Labro, A.J., Raes, A.L., Bellens, I., Ottschyttsch, N. & Snyders, D.L. (2003) Gating of shaker-type channels requires the flexibility of S6 caused by prolines. *J Biol Chem.* 278(50):50724-31.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

Lepre, C.A & Moore, J.M., (1998) Microdrop screening: a rapid method to optimize solvent conditions for NMR spectroscopy of proteins. *J.Biomol. NMR* **12**, 493

Lingrel, J.B. & Kuntzweiler, T. (1994) Na^+,K^+ -ATPase. *J. biol. Chem.* **269**:19659-19662

Long, S.B., Campbell, E.B. & MacKinnon, R. (2005) Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K^+ Channel. *Science* **309** 897-903.

Long, S.B., Campbell, E.B. & MacKinnon, R. (2005b) Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling. *Science* **309** 903-908

Lopez-Barneo, J., del Toro, R., Levitsky, K.L., Chiara, M.D., & Ortega-Saenz, P. (2004) Regulation of oxygen sensing by ion channels. *J. Appl. Physiol.* **96**: 1187-1195.

Lotz, M.M., Wang, H., Song, J.C., Pories, S.E. & Matthews, J.B. (2004). K^+ channel inhibition accelerates intestinal epithelial cell wound healing. *Wound Repair Regen.* **12**: 565-574.

MacKinnon, R. (2003) Potassium Channels. *FEBS Letters* **555** 62-65.

Matthews, S. (2004) Perdeuteration/Site-Specific Protonation Approaches for High-Molecular-Weight Proteins. *Methods in Molecular Biology*, **vol.278: Protein NMR Techniques** 35-45

Meyer, S.M. (2005) NMR-spektroskopische Charakterisierung der C-terminalen Domäne des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.4 und ihrer Interaktion mit der T1-Domäne und einer PDZ-Domäne. *Diplomarbeit* Universität Regensburg.

Miller, C. (2001) See Potassium Run. *Nature* **414** 23-24

Minor, D.L. Jr., Lin, Y.F., Mobley, B.C., Avelar, A., Jan, Y.N., Jan, L.Y. & Berger, J.M. (2000) The Polar T1 Interface Is Linked to Conformational Changes that Open the Voltage-Gated Potassium Channel. *Cell* **102**, 657-670.

Misonou, H. & Trimmer, J.S. (2004) Determinants of Voltage-Gated Potassium Channel Surface Expression and Localisation in Mammalian Neurons. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **39** 125-145

Mühlhard, C. (1999) Der Experimentator: Molekularbiologie; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Neher, E. & Sakman, B. (1992) The Patch clamp technique. *Scientific American* **266** (3) 28-35

O'Grady, S.M. & Lee, S.Y. (2005) Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**: 1578-1594.

Pervushin, K. (2000) Impact of transverse relaxation optimized spectroscopy (TROSY) on NMR as a technique in structural biology. *Quarterly Reviews in Biophysics* **33**:161-197

Pervushin, K., Riek, R., Wider, G.& Wüthrich, K. (1997) Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *PNAS* **94**:12366-12371.

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., & Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to Protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599

Rudolph, R. et al. in: Creighton, T.E., (1997) Isolation and solubilisation of inclusion body protein. *IRL Press, New York: Protein Function 2nd edition*; 67ff

Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H. & Jaenicke, R. (1997) Folding proteins in *Protein Function A Practical Approach* *Irl Press/Oxford University Press New York* 57-96

Salkoff, L. & Wyman, R. (1981) Genetic modification of potassium channels in Drosophila Shaker mutants. *Nature* **5829**: 228-30

Sands, Z., Grottesi, A., & Sansom, M.S.P. (2005) Voltage-gated ion channels. *Current Biology* **15** (2) R44-7.

Sankaranarayanan, K., Varshney, A. & Mathew (2005) N type rapid inactivation in human Kv1.4 channels: functional role of a putative C-terminal helix. *Molecular Membrane Biology* **22** (5) 389-400.

Schreier, C. (2002) Expression und Charakterisierung der N-terminalen cytosolischen Domäne des schnell-inaktivierenden K⁺-Kanals Kv3.4. *Diplomarbeit* Universität Regensburg

Shägger, H.& von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**, 368-379

Sokolova, O., Accardi, A., Gutierrez, D., Lau, A., Rigney, M. & Grigorieff, N. (2003) Conformational changes in the C terminus of Shaker K⁺ channel bound to the rat Kvβ2-Subunit. *PNAS* **100** (22) 12607-12612

Stühmer, W., Ruppertsberg, J.P., Schröter, K.H., Sakman, B., Stocker, M., Giese, K.P., Perschke, A., Baumann, A. & Pongs, O (1989) Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium Channels in Mammalian brain. *The EMBO Journal* **8 (11)** 3235-3244

Tartof, K.D. & Hobbs, C.A., (1987) Improved Media for Growing Plasmid and Cosmid Clones, *Bethesda Res. Lab. Focus* **9:12**.

White, J.A., McAlpine, P.J., Antonarakis, S., Cann, H., Eppig, J.T., Frazer, K., Frezal, J., Lancet, D., Nahmias, J., Pearson, P. et al. (1997) Guidelines for Human Gene Nomenclature. *Genomics* **45 (2)**, 468-471.

Wiedemann, D. (2005) Expression und Charakterisierung der C-terminalen Domäne des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.4. *Diplomarbeit* Universität Regensburg.

Winklmeier, A. (2005) Expression und strukturbiologische Charakterisierung der Tetramerisierungsdomäne des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.3 aus *Homo sapiens*. *Diplomarbeit* Universität Regensburg.

Wissmann, R., Baukrowitz, T., Kalbacher, H., Kalbitzer, H.R., Ruppersberg, J.P., Pongs, O., Antz, C. and Fakler, B. (1999) NMR Structure and Functional Characteristics of the Hydrophilic N Terminus of the Potassium Channel β -Subunit Kv β 1.1. *The Journal of Biological Chemistry* **274** (50) 35521-35525.

Wissmann, R., Bildl, W., Oliver, D., Beyermann, M., Kalbitzer, H.R., Bentrop, D. & Fakler, B. (2003) Solution Structure and Function of the "Tandem Inactivation Domain" of the Neuronal A-type Potassium Channel Kv1.4. *The Journal of Biological Chemistry* **278** (18) 16142-16150.

Wüthrich K. (1986) NMR of Proteins and Nucleic Acids. *John Wiley & Sons, New York*

Yellen, G. (1998) The moving parts of voltage gated ion channels. *Quarterly reviews of Biophysics* **31**, 3 239-295

Yi, B.A., Minor, D.L. Lin, Y.F., Jan, N.J. & Jan, L.Y. (2001) Controlling potassium channel activities: Interplay between the membrane and intracellular factors. *PNAS* **98** (20) 11016-11023.

Zerangue, N., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (2000) An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional Shaker channels lacking T1. *PNAS* **97** 3591-3595

Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufmann, A. & MacKinnon, R. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* **414** 43-48

Zhou, Y. & MacKinnon, R. (2003) The Occupancy of Ions in the K⁺ Selectivity Filter: Charge Balance and Coupling of Ion Binding to a Protein Conformational Change Underlie High Conduction Rates. *J. Mol. Biol.* **333** 965-975

Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Mann, S. & MacKinnon, R. (2001) Potassium Channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* **411** 657-661

7 Abkürzungsverzeichnis:

A	Ampere
Å	Ångstrom
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circulardichroismus
CV	Säulenvolumen
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylediamintetraessigsäure
GST	Glutathion-S-Transferase
GdmHCl	Guanidinium Hydrochlorid
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HUGO	Human Genome Organisation
IP	Inaktivierungspeptid (Inactivation Peptide)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
IUPHAR	International Union of Pharmacology
K	Kelvin
kDa	Kilodalton (Einheit der molaren Masse)
KDZ	Kaliumphosphat-DTE-Zink Puffer
K _{ir}	Kaliumkanal (inward rectifier)
KP _i	anorganisches Kaliumphosphat (Puffer)
K _v	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal
M _r	relative Molekülmasse
MW	molare Masse
MWCO	Molecular weight cutoff
NaP _i	anorganisches Natriumphosphat (Puffer)
NMM	New Minimal Medium
NMR	Kernmagnetresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NOESY	Nuclear Overhauser Effekt Spectroscopy
OD ₅₉₅	Optische Dichte (Absorptionwert einer Bakteriensuspension) bei 595 nm
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese

PEG	Polyethylenglykol
P-Loop	Poren Loop
pl	Isoelektrischer Punkt
PP	Polypropylen
RT	Raumtemperatur
SD	Superdex (Säulenmatrix für Größenausschlusschromatographie)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Detergenz)
T1	Tetramerisierungsdomäne eines K _v Kanalproteins
Tab.	Tabelle
TB	Terrific Broth
TDE	Tris-DTE-EDTA Puffer
TDZ	Tris-DTE-Zink Puffer
TEA	Tetraethylammoniumchlorid (Kanalblocker)
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	Transverse-relaxation optimized spectroscopy
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche

Anhang:

ClustalW Alignments

Die Alignments wurden erstellt mit Hilfe der Clustal Software (Chenna 2003)

Vergleich des K_v1.4 T1K Konstrukts mit den T1 Domänen von K_v1.2 und aK_v1.1

Kv14_T1K	ERVVINVSGLRFETQMKTLAQFPETLLGDPKEKRTQYFDFPLRNEYFFDRNRPSFDAILY 60
Kv12_1QDV	ERVVINVSGLRFETQLKTLAQFPETLLGDPKKRMRYFDFPLRNEYFFDRNRPSFDAILY 60
aKv11_T1	ERVVINVSGLRFETQLKTLNQFPDTLLGNPQKRNRYYDPLRNEYFFDRNRPSFDAILY 60
	*****:*****:***:***:***:***:*****:*****:*
Kv14_ T1K	QSGGRLKRPVNVPFDIFTEEVKFYQLG----- 87
Kv12_1QDV	QSGGRLRRPVNPVPLDIFSEEIRFYELGEEAMEMFREDE--- 98
aKv11_ T1	QSGGRLRRPVNPVPLDVFSEEIKFYELGENAFERYREDEGFI 101
	*****:*****:***:***:***:***:*

N-Terminale Sequenzen von K_v1.4 und aK_v1.1 bis zum Beginn der S1-Helix

Die untersuchten Konstrukte von K_v1.4, IP und T1K sind blau unterlegt

Das von Baker et al. untersuchte aKv1.1 T1 Konstrukt ist grau markiert.

KV1.4	MEVAMVSAESSGCNSHMPYGYAAQARARERERLAHSAAAAAVAAAATAAVEGTGGSGGG	60
aKV1.1	MEVAMAG-----IEGNGG-----	13
	*****.. : : : : **.*	
KV1.4	PHHHHQTRGAYSSHDPQGSRGSREEEATRTEKKKLHHRQSSFPHCSDLMPGSEEKILR	120
aKV1.1	-----PAGYRDS-----YHSSQRPLLSSNLPNRSR----FP	41
	* * *. * * . : . : * * * * : :	
KV1.4	ELSEEEEDEEEEEEEEGRFYYSEEDHGDCSYTDLQPDDGGGGYSSVRYSDCCEERV	180
aKV1.1	KLSEEDNANEN-----GMGVPGSDYDCSCSERV	68
	:****: :*: : : : : : : * * .. * . . ****	
KV1.4	VINVSGLRFETQMKTLaQFPETLIGDPEKRTQYFDPLRNEYFFDRNRPSFDAILYQQSG	240
aKV1.1	VINVSGLRFETQLKTLNQFPDTLLGNPQKRNRYYDPLRNEYFFDRNRPSFDAILYFYQSG	128
	*****: *** : *** : *** : *** : : : *****: ***	
KV1.4	GRLKRPVNPFDIFTEEVKFYQLGEALLKFREDEGFVREEEDRALPENEFKKQIWLLE	300
aKV1.1	GRLRRPVNP LDVFSEEIKFYELGENAFERYREDEGFIKEEE-KPLPQNEFQRRVWLLE	187
	*****: *** : *** : *** : . : * : *** : *** . : *** : ***	

Sequenzen der K_v Kanalproteine, die Gegenstand dieser Arbeit sind, im Alignment

Alle wichtigen Konstrukte sind grau bzw blau hinterlegt.

KV1.3	-----	-----MTVPGDHLLPEVADGGG-----	19
KV1.4	MEVAMVSAESSGCNSHMPYGYAAQARARERERLAHSRAAAAAAATAAVEGTGGSGGG	60	
KV3.4	-----MISSVCVSSYGRKSGNKPPSKTCLKEEMAKGEASEKIIINVGGT	45	
	-----: . . : * * -----		
KV1.3	-----APPQGGCG-----	27	
KV1.4	PHHHHQTRGAYSSHDPQGSRGSREEEATRTEKKKLHHRQSSFPHCSDLMPGSEEKILR	120	
KV3.4	RHETYRSTLRTLPGTRLAWLAD-----	67	
	-----: . . : * * -----		
KV1.3	-----GGGCDRYEPLPPSLPAAG-----EQDCGER	53	
KV1.4	ELSEEEEDEEEEEEEGRFYSEEDHGDCSYTDLLPQDDGGGGYSSVRYSDCC-ER	179	
KV3.4	-----PDGGGRPESDGAGSSGGGGCEFFFDR	99	
	-----: . : * . . * : : -----		
KV1.3	VVINISGLRFETQLKTLQFETLLGDPKRRMRYFDPLRNEYFFDRNRPSFDAILYQQQS	113	
KV1.4	VVINVSGLRFETQMKTLAQFPETLLGDPEKRTQYFDPLRNEYFFDRNRPSFDAILYQQQS	239	
KV3.4	HPG-VFAYVLNYYRTGKLHCPADVCGPLFEELTFWGIDETDVEPCCWMTRYQHRDAEEA	158	
	-----: . : * : * . . * : : -----		
KV1.3	GGRIRRPNVPIDIFSEEIRFYQLGEEAMEKFREDEGFLREEE-RPLPRRDFAQQWLLF	172	
KV1.4	GGRLKRPVNVPFDIFTEEVKFYQLGEEALLKFREDEGFVREEEDRALPENEFKKQIWLLF	299	
KV3.4	LDIFESPDDGGGGAGPGDEAGDDERELALQRLGPHEGGSGPAGSGGGCRG-WQPRMWALF	217	
	-----: . : * . . : : * : : * : * * -----		
KV1.3	EYPESSGPARGIAIVSVLVILISIVFCLETLPFRDEKDYPASTSQDSFEAAGNSTSG-	231	
KV1.4	EYPESSSPARGIAIVSVLVILISIVFCLETLPFRDDRLIMALSAGGHSRLLNDSAP	359	
KV3.4	EDPYSSRAARVVAFASLFFILVSITTCLETHEAFNIDRNVTEIHRVGNITSVR-----	271	
	* * ** . ** : * : . ** : * . * * * * . : : -----		
KV1.3	--SRAGASSFSDPFFVVETLCIWIWSFELLVRFFACPSKATFSRNIMNLIDIVAIIPYFI	289	
KV1.4	HLENSGHTIFNDPFFIVETVCIVWWSFVFVRCFACPSQALFFKNIMNIIDIVSILPYFI	419	
KV3.4	--FRREVETEPILTYIEGVCVMWFTLEFLVIRIVCCPDTLDVFKNLLNIIDFVAILPFYL	328	
	-----: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : -----		
KV1.3	TLGTELATERQNG---QQAMSLAILRVIRLVRVFRIFKLSRSKGLQILGQTLKASMRE	345	
KV1.4	TLGTDLAQQQGGGGNGQQQAMSFAILRIIRLVRVFRIFKLSRSKGLQILGHTLRASMRE	479	
KV3.4	EVGLSGLSSKAAR-----DVLGFLRVVRFVRILRIFKLTFRHVGLRVLGHTLRASTNE	381	
	: * . . : . : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : -----		
KV1.3	LGLLIIFLFIGVILFSSAVYFAEADDP-----TSGFSSIPDAFWAVVTMTTVGYG	396	
KV1.4	LGLLIIFLFIGVILFSSAVYFAEADEP-----TTHFQSIPDAFWAVVTMTTVGYG	530	
KV3.4	FLLLLIIFLALGVLIIFATMIYAAERIGARPSDPRGNDHTDFKNPIIGFWAVVTMTLGY	441	
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : -----		
KV1.3	DMHPVTIGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNFNYFYHRETEGEESQ-----	446	
KV1.4	DMKPITVGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNFNYFYHRETENEEQTQ-----	580	
KV3.4	DMYMPKTWSGMLVGALCALAGVLTIAMPPVIVNNFGMYYSLAMAKQKLPKKRKKHVRPRP	501	
	* * * * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : -----		
KV1.3	-----YMH-VGSCQHLSS-SAEELRKARSNSTLSKSEYMVIEEGG-----	484	
KV1.4	-----LTQNAVSCPYLPNSNLKKFRSSTSSSLGDKSEYLEMEEG-----	619	
KV3.4	QLESPIYCKSEETSPRDSTYSDTSPPARREGMVERKRADSKQNGDANAVLSDDEEGAGLTQ	561	
	-----: . : : * .. . : . : * : * : -----		
KV1.3	MNHSAFPQTPFKTGNSSTATCTTNNNPNSCVNICKIFTDV-----	523	
KV1.4	VKESLCGKEEKCQGKDDSETDKNN--CSNAKAVETDV	655	
KV3.4	PLASAPTPEERRALRRSGTRDRNKKAACFLSAGDYACADGSVQKEGSVEPKACVPVSH	621	
	* . : : : * . . : * : * : -----		
KV1.3	-----		
KV1.4	-----		
KV3.4	TCAL 625		

Sequentielle Zuordnung des K_v1.4 T1K Konstrukts (Peakliste)

Residue #	H ^N	N ^H	C ^α	C ^β
01M	-	-	-	-
02E	-	-	56,78	29,38
03R	7,22	113,72	54,97	30,61
04V	8,83	123,79	60,87	32,92
05V	8,76	126,97	60,39	31,71
06I	9,43	129,02	60,79	39,44
07N	9,66	128,74	50,31	38,27
08V	8,89	126,18	60,43	29,56
09S	8,61	119,14	59,04	62
10G	8,93	112,08	44,77	-
11L	8,37	128,14	53,32	41,27
12R	8,18	126,64	56,27	30,03
13F	9,89	126,17	56,34	40,08
14E	7,53	120,66	53,84	33,58
15T	8,35	114,50	58,04	68,10
16Q	8,81	121,46	53,89	30,11
17M	8,99	125,55	58,19	32,96
18K	8,18	115,64	57,82	-
19T	7,27	116,53	65,38	-
20L	7,03	120,45	59,23	40,04
21A	7,25	118,9	53,16	19,15
22Q	7,03	121,08	61,56	32,33
23F	7,67	117,65	57,84	-
24P	-	-	64,03	31,34
25E	8,32	115,71	57,43	30,17
26T	7,35	119,08	64,81	66,98
27L	6,76	119,58	55,82	39,66
28L	6,73	116,15	54,80	40,12
29G	7,26	103,96	44,33	-
30D	7,12	121,79	49,52	-
31P	-	-	-	-
32E	-	-	58,14	27,50
33K	7,69	119,95	56,90	28,39
34R	7,85	119,39	57,61	26,69

Residue #	H ^N	N ^H	C ^α	C ^β
35T	7,35	116,34	66,00	67,89
36Q	7,69	119,95	56,94	27,20
37Y	7,91	117,77	56,85	37,26
38F	7,78	122,96	57,00	38,65
39D	8,40	129,12	48,26	-
40P	-	-	63,46	31,01
41L	9,36	119,95	55,31	28,03
42R	8,75	129,90	52,46	32,84
43N	8,68	127,91	52,5	41,34
44E	8,34	127,78	52,34	31,38
45Y	8,68	120,84	57,84	38,81
46F	8,55	124,15	55,6	40,59
47F	8,31	124,76	55,55	40,94
48D	8,98	129,96	50,6	38,38
49R	6,87	116,4	54,44	30,09
50N	7,90	119,34	53,23	35,92
51R	6,83	113,81	53,06	-
52P	-	-	62,40	44,06
53S	7,82	120,46	62,40	31,83
54F	9,23	124,58	61,84	38,62
55D	9,06	118,42	55,68	38,89
56A	7,82	116,84	52,39	17,21
57I	6,92	114,83	56,81	38,96
58L	7,99	117,72	59,91	37,09
59Y	7,53	123,53	60,43	-
60Y	-	-	60,36	36,37
61Y	7,24	115,22	60,36	36,67
62Q	7,71	118,15	57,84	27,17
63S	8	111,4	57,31	63,47
64G	7,64	110,9	45,64	-
65G	8,35	107,97	44,1	-
66R	7,56	121,4	55,42	23,96
67L	7,06	114,52	54,99	36,7
68K	8,76	117,32	55,29	40,59
69R	9,32	125,73	59,45	-

Residue #	H ^N	N ^H	C ^α	C ^β
70P	-	-	61,24	30,68
71V	8,33	119,67	63,86	30,11
72N	8,29	113,68	52,46	36,14
73V	7,65	123,35	58,66	-
74P	-	-	64,65	-
75F	7,69	110,71	62,87	30,8
76D	7,7	119,34	56,24	37,39
77I	7,23	122,03	64,4	37,04
78F	8,28	119,84	61,67	38,15
79T	8,36	112,82	65,91	67,21
80E	7,03	121,08	58,3	29,52
81E	8,75	116,34	57,88	27,05
82V	8,07	120,41	66,89	29,97
83K	7,45	117,7	58,17	30,85
84F	7,91	123,91	61,25	37,58
85Y	8,17	113,78	59,85	35,32
86Q	7,77	118,96	55,40	28,79
87L	8,49	124,95	54,12	39,19
88G	7,91	107,15	44,03	-
89K	7,95	120,93	55,86	32,17
90L	8,23	123,57	54,16	40,55
91A	8,18	124,91	52,10	17,70
92A	8,08	122,31	51,97	17,70
93A	7,99	122,57	51,97	17,77
94L	7,95	120,93	54,64	40,67
95E	8,11	121,38	55,88	28,92
96H	8,35	120,46	55,54	-
97H	8,68	121,42	54,71	-
98H	8,55	121,28	54,90	-
99H	8,73	121,46	54,88	51,03
100H	8,29	126,61	56,14	-

Übertragene Zuordnung des K_v1.4 Inaktivierungspeptids

Ursprüngliche Zuordnung: Wissmann 2003

Residue #	H ^N	N ^H
02S	8,51	119,46
03T	8,32	117,27
04M	8,36	123,53
05E	8,32	123,71
06V	8,13	122,84
07A	8,31	128,53
08M	8,34	121,71
09V	8,09	123,28
10S	8,38	120,71
11A	8,45	127,28
12E	8,29	121,21
13S	8,22	117,27
14S	8,29	118,46
15G	8,36	111,34
16C	8,14	119,40
17N	8,49	121,90
18S	8,15	116,77
19H?	8,45	121,21
20M	8,15	122,90
22Y	8,34	122,53
23G	8,30	112,27
24Y	7,95	121,46
25A	8,38	124,40
26A	8,15	122,71
27Q	7,98	119,78
28A	8,03	124,09
29R	7,99	119,59
30A	7,84	123,65
31R	8,05	119,53
32E	7,88	121,53
33R	8,04	121,96
34E	7,91	120,90
35R	8,00	120,34

Residue #	H ^N	N ^H
36L	8,08	121,46
37A	7,89	122,78
38H?	8,24	118,34
39S	8,28	117,46
40R	8,36	123,90
41A	7,99	124,09
42A?	8,07	122,28
43A?	8,05	123,53
44A?	7,99	122,71
45A?	7,94	123,09
46A	7,82	122,96
47V	7,74	120,34
48A	7,95	125,46
49A?	7,89	122,03
50A?	7,99	123,21
51T	7,94	114,21
52A	7,95	126,21
53A?	8,00	122,09
54V	7,88	119,65
55E	8,37	124,90
56G	8,35	110,59
57T	8,09	113,34
58G	8,50	111,96
59G	8,23	109,34
60S	8,36	116,52
61G	8,51	111,77
62G	8,15	109,59
63G	8,26	109,59
65H?	8,72	121,65
66H?	8,78	121,90
67H	8,33	120,21
68H?	8,64	123,15
69Q	8,71	123,59
70T	8,34	117,59
71R	8,47	124,90

Residue #	H ^N	N ^H
72G	8,41	111,09
73A	8,12	124,40
74Y	8,15	120,09
75S	8,02	118,46
76S	8,28	118,78
77H	8,23	120,59
78D	8,13	127,53

Daten zur Auswertung der Diffusionsmessung

Werte für die Diffusionskonstante, die rechnerische Masse ist für die T1-Konstrukte als Monomer / Tetramer jeweils in kDa angegeben

Substanz	D	Masse (kDa)
Vitamin B ₁₂	0,73758	1,35
RNAseA	0,45766	13,4
Transferrin	0,14889	81,0
K _v 1.4 T1K	0,22798	12,1 / 48,4
K _v 3.4 153H	0,16977	18,2 / 72,46

Daten zur Bestimmung von K_D in der Titration von K_v1.4 T1K mit dem K_v1.4 IP

Fitgleichung (für OriginTM angepasst), (Geyer 2003)

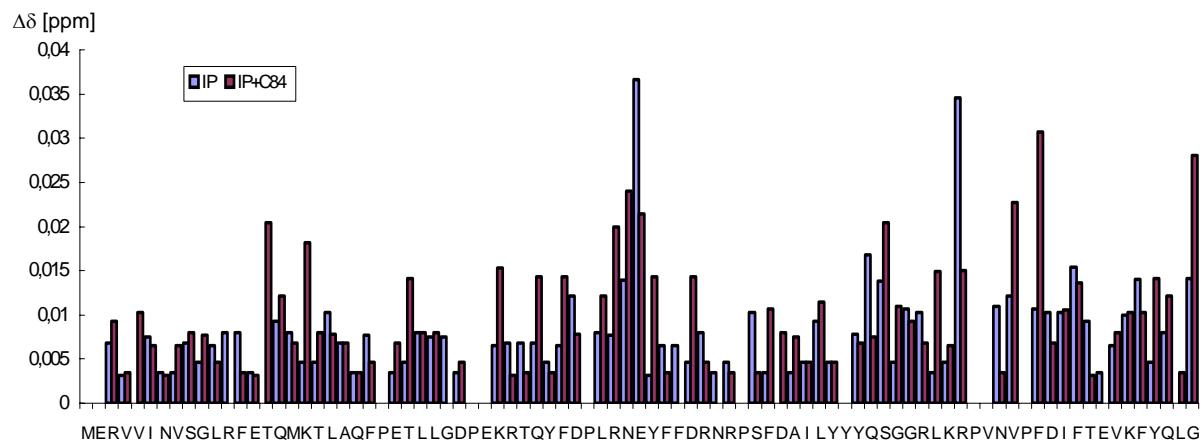
$$y = M \left((0.48 + x + K) - ((0.48 + x + K)^2 - (4 * 0.48 * x))^{(1/2)} \right) / (2 * 0.48)$$

K= Dissoziationskonstante K_D (mM) M= Maximalwert für y (Shift bei Sättigung)

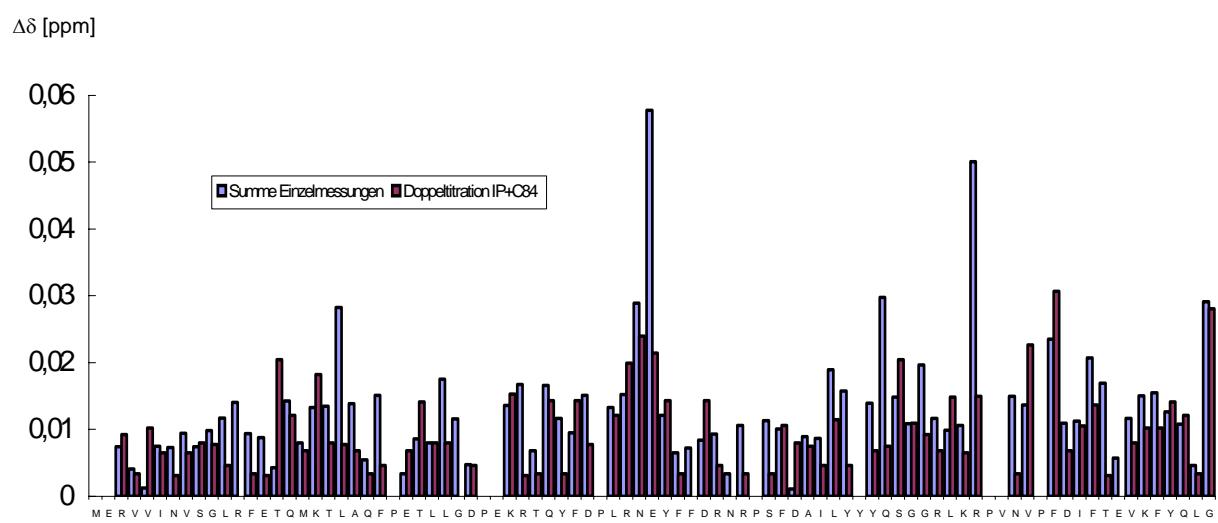
Rest #	K _D	M
I77	0.10165	0.00369
E44	1.36605	0.03064
V73	0.14505	0.0074
R69	1.37137	0.02366
N43	0.14456	0.00834

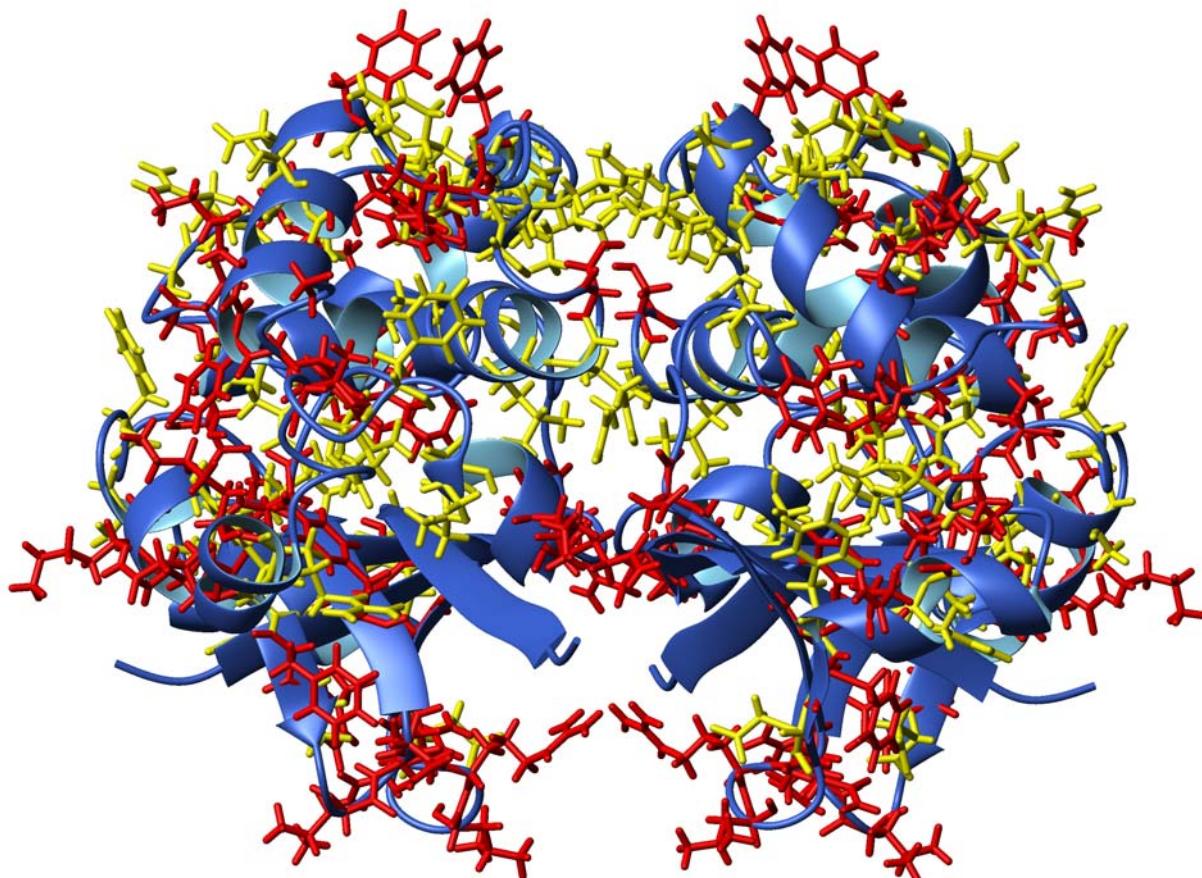
Doppeltitration von K_v1.4 T1K mit IP und C84: weitere Vergleichsgraphen

Shifts nach Zugabe von IP und C84 (rot) verglichen mit den Shifts nur mit IP-Zugabe aufgetragen gegen die Sequenz des K_v1.4 T1K Konstrukts



Shifts nach Zugabe von IP und C84 (rot) verglichen mit der Addition der Shifts nur mit IP und nur mit C84, aufgetragen gegen die Sequenz des K_v1.4 T1K Konstrukts



MolMol™ Darstellung der Ergebnisse der Doppeltitration

Dargestellt ist das Homlogiemodell des Kv1.4 T1K Tetramers (blau schattiert). Rot dargestellt sind Reste, deren Interaktion in Anwesenheit beider Interaktionspartner (IP und C84) stärker ist als in den Einzeltitrationen. Gelbe Reste zeigen eine Abnahme der Intensität oder völliges Fehlen der Wechselwirkung.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig vefasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Regensburg, Dezember 2006

.....
Christina Schreier

Lebenslauf

Christina Schreier

Persönliche Daten

Geburtsdatum 17.09.1976
Geburtsort Höxter, NRW

Schulische Ausbildung

01.09. 1983-29.05.1996 Besuch der Städtischen Gemeinschaftsgrundschule Beverungen und des Städtischen Gymnasium Beverungen, NRW
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

01.10.1996-05.03.1999 Grundstudium im Studiengang Biochemie (Diplom) an der Universität Regensburg

05.03.1999-02.01.2002 Hauptstudium im Studiengang Biochemie (Diplom) an der Universität Regensburg. Abschluss des Studiums als Diplom Biochemikerin (Univ.)
Thema der Diplomarbeit „Expression und Charakterisierung der N-terminalen cytosolischen Domäne des schnellaktivierenden K⁺-Kanals K_v3.4“

31.07.-03.10.2000 Praktikum in San Luis, Argentinien bei der Umwelt- und Biotechnologiefirma „BIOLAB Consultora Industrial“. Bearbeitung eines Projekts zur Etablierung eines biologischen Abbauverfahrens für Kohlenwasserstoffe (Schmier- und Treibstoffverschmutzungen) in kontaminiertem Erdreich

seit 01.02.2002 Promotion am Lehrstuhl für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg bei Herrn Prof. Dr. Dr. Kalbitzer.
Thema:
„NMR-spektroskopische und biochemische Charakterisierung der Tetramerisierungsdomäne des spannungsgesteuerten Kaliumkanals K_v1.4 und ihrer Interaktionen mit den N- und C-terminalen cytosolischen Domänen des Kanalproteins“

Danksagung

Ich danke Professor Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer, der diese Arbeit betreut hat und mir neben der sehr interessanten und vielschichtigen Themenstellung am Lehrstuhl für Biophysik und physikalische Biochemie einen großzügigen und vor allem gut ausgestatteten Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt hat, so dass sich unser „Ionenkanalprojekt“ langsam aber doch stetig entwickeln konnte.

Mein besonderer Dank gilt hier PD Dr. Werner Kremer, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich vor allem bei der Aufnahme und Auswertung der NMR-Spektren und vielen anderen Problemen biophysikalischer Natur mit großer Geduld unterstützt hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei all denen, ohne deren Zutun an ein solches Projekt gar nicht zu denken wäre: Professor Dr. Bernd Fakler von der Uni Freiburg und seine Mitarbeiter, die sowohl die cDNA für die Kv1.4 und Kv3.4 Kanalkonstrukte als auch das Konstrukt des IP und eine ¹⁵N Proteinprobe zur Verfügung gestellt haben. Alexandra Auer, die das Kv1.4 T1K Konstrukt kloniert, hat. Doris Wiedemann und Simon Meyer, die sich als Diplomanden mit dem C84 Konstrukt herumgeplagt haben und Andreas Winklmeier, der (bis wir es selbst gesehen haben) nicht gedacht hätte, dass er in einer NMR-Gruppe Proteinkristalle züchten würde.

Auch meine Kollegen hier am Lehrstuhl waren bei den verschiedensten Problemen, die eigentlich genau dann auftreten, wenn gerade wirklich genug zu tun ist, immer bereit mir weiterzuhelfen: Peter Geyer, Ralf Elsner und Norman Kachel bei allen möglichen Computer-Modeling- und MolMol-Problemen, Wolfram Gronwald und Konrad Brunner als Auremol Experten, Michael Spörner, Roland Hofweber und Frank Schumann, die immer wieder als (manchmal unfreiwillige) Diskussionspartner mitgeholfen haben, meine Ideen weiterzuentwickeln und Dörte Rochelt, die immer einen guten Rat und ein offenes Ohr für mich hatte, wenn organisatorische Dinge nicht recht funktionieren wollten. Für die gute und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre danke ich allen Mitgliedern des Lehrstuhls, die Cocktailabende, Dultbesuche usw. waren immer wieder eine sehr willkommene Abwechselung im manchmal doch etwas tristen und nervenaufreibenden Laboralltag.

Auch meine Eltern, mein Bruder, meine Familie und meine Freunde oder besser gesagt meine Regensburger „Ersatzfamilie“ im Sanjuro Dojo haben viel mehr zu dieser Arbeit beigetragen, als sie sich vorstellen können. Neben der Unterstützung in jeder Form die ich von allen erfahren habe, war es vor allem der Rückhalt im ganz normalen Leben, den ich nicht missen möchte.