
Struktur-Funktions-Analyse von Tok1p, ein spannungsabhängiger Kaliumkanal in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Biologin
Anja Roller

aus

Pforzheim

Dekan: Prof. Dr. M. Kappes
Referent: HD Dr. A. Bertl
Korreferent: Prof. Dr. G. Thiel
Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2005

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die gemäß Wortlaut oder Inhalt aus anderen Arbeiten entnommen sind, wurden durch Angabe der Quellen als Entlehnungen kenntlich gemacht.

Keltern, im Februar 2005

Anja Roller

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut, Lehrstuhl 1 der Universität Karlsruhe (TH), unter der Leitung von HD Dr. A. Bertl im Zeitraum von Juni 2002 bis Februar 2005 angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn HD Dr. A. Bertl für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen und für die wertvollen wissenschaftlichen Anregungen.

Bei Frau Sybille Wörner bedanke ich mich für Ihre immer offene und hilfsbereite Art, egal welche Problemstellung es zu diskutieren galt.

Dr. H. Bihler möchte ich für die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen über den „Schreibtisch hinweg“ danken.

Dr. G. Natura danke ich für die Geduld, die er aufgebracht hat um mir die praktische Anwendung der Patch-Clamp-Methode näher zu bringen.

Bei Diplom-Biologe C. Eing bedanke ich mich für Tipps, die Rechtschreibung dieses Manuskripts betreffend.

Hannes danke ich für seine Unterstützung während meines gesamten Studiums, ganz besonders in der Endphase dieser Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung durch ein Stipendium nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz von Oktober 2002 bis September 2003 möchte ich mich bei der Vergabekommission der Universität Karlsruhe bedanken.

Mein Dank für die finanzielle Unterstützung seit Oktober 2003 geht an die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Publikationen

Becker, D., Geiger, D., Dunkel, M., Roller, A., Bertl, A., Latz, A., Carpaneto, A., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G., Voelker, C., Schmidt, D., Mueller-Roeber, K., Czempinski, K., Hedrich, R. 2004. AtTPK4, an *Arabidopsis* tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺ - dependent manner. PNAS 101:15621-15626

Poree, F., Wulfetange, K., Naso, A., Carpaneto, A., Roller, A., Natura, G., Bertl, A., Sentenac, H., Thibaud, JB, Dreyer, I. 2005. Plant K(in) and K(out) channels: Approaching the trait of opposite rectification by analyzing more than 250 KAT1-SKOR chimeras. Biochem Biophys Res Commun. 332(2):465-473.

Roller, A., Bihler, H., Slayman, C., Eing, C., Bertl, A., Natura, G. 2005. In the Yeast Potassium Channel, Tok1p, the external Ring of Aspartate Residues Modulates both Gating and Conductance. Pflügers Arch–Eur J Physiol. (im Druck)

Bihler, H., Eing, C., Hebeisen, S., Roller, A., Czempinski, K., Bertl, A. 2005. TPK1 (KCO1) is a vacuolar ion channel different from the slow-vacuolar (SV) cation channel. Plant Physiology (im Druck)

Kongressmitteilungen

Bihler, H., Natura, G., Roller, A., C.L., Slayman, Bertl, A. 2004. Gating and permeation of the *Saccharomyces* K⁺ channel, Tok1p, are controlled by distinct amino acids within the two pore loops. [Meeting] Biophysical Journal. 86(1). 258a.

Natura, G., Roller, A., Bihler, H., Bertl, A. 2003. Distinct amino acid residues within the pore loop determine K⁺-dependent gating and pore stability in the yeast K⁺ channel, Tok1. [Meeting] Yeast. 20(Supplement 1). July 2003. S241.

Roller, A., Natura, G., Bihler, H., Slayman, C.L., Bertl, A. 2004. Gating and permeation of the *Saccharomyces* K⁺ channel, Tok1p, are controlled by distinct amino acids within the two pore loops. Handbuch zur Botanikertagung in Braunschweig. S.95.

1. Einleitung	1
1.1 Ionenkanäle.....	1
1.2 Strukturmerkmale spannungsabhängiger Kaliumkanäle	1
1.2.1 Selektive Permeabilität	3
1.2.2 Kanalassemblierung	6
1.2.3 Aktivierung/Inaktivierung.....	7
1.3 Tok1p ein spannungsabhängiger Kaliumkanal im Plasmalemma von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
1.3.1 Identifizierung	9
1.3.2 Struktur	9
1.3.3 Funktionale Domänen.....	10
1.3.4 Mögliche Regulationsdomänen	12
1.3.5 pH-Abhängigkeit von Tok1p	13
1.3.6 Modulation des Schaltverhaltens	13
1.3.7 Elektrophysiologische Charakterisierung.....	14
1.4 Kaliumhaushalt von <i>S. cerevisiae</i>	15
1.4.1 Kaliumabhängiges Wachstum als Funktion von Trk1p, Trk2p und Tok1p	16
1.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als eukaryotischer Modellorganismus zur Struktur-/Funktionsanalyse von K ⁺ -Kanälen	17
1.5.1 Heterologe Expression von Tok1p und Tok1p-Mutanten in Xenopus-Oozyten	17
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	18
2. Material und Methoden	20
2.1 Verwendete Organismen und Plasmide.....	20
2.1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme.....	20
2.1.2 <i>E. coli</i> Stämme.....	20
2.1.3 Verwendete Plasmide.....	21
2.1.4 Synthetische Oligonucleotide	22
2.2 Medien	22
2.2.1 Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	22
2.2.2 Medien zur Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.2.3 Medien zur Protoplastierung und Patch-Clamp-Messungen von Hefezellen	23
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	24
2.3.1 Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	24
2.3.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit Hilfe der CaCl ₂ -Methode/Hitzeschock	24
2.3.3 Isolierung der Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	25
2.3.4 Klonierungsstrategie der C- bzw. N-terminalen Tok1p-Deletionsmutanten	25
2.3.5 Mutagenese der Tok1p-Deletionsmutanten.....	26
2.3.6 Präparative Agarosegele zur Isolierung und Aufreinigung der PCR-Fragmente	27
2.3.7 Restriktionsspaltung der PCR-Fragmente	27
2.3.8 Restriktionsspaltung und Aufreinigung des Vektorfragments pSUF	28
2.3.9 Ligation	28
2.3.10 Amplifizierung der Tok1p-Aminosäure-Austauschmutanten über Site-Directed-Mutagenese	29
2.3.11 Überprüfung der Mutationen durch Sequenzierung.....	29
2.3.12 Herstellung und Transformation kompetenter Hefen	29
2.4 Zellbiologische Methoden.....	30
2.4.1 Durchführung der Wachstumsversuche.....	31

2.4.2	Test der Tok1p-Mutanten auf Funktionalität.....	32
2.4.3	Wachstumsversuche zur Selektivität.....	32
2.5	Elektrophysiologie / Patch-Clamp-Methode.....	32
2.5.1	Protoplastierung von <i>S. cerevisiae</i>	32
2.5.2	Durchführung der Elektrophysiologie und Datenanalyse	33
2.6	Simulation der elektrophysiologischen Ganzzellableitungen	34
3.	Ergebnisse	39
3.1	Phänotyp von Tok1p (Wildtypkanal).....	39
3.2	Test der Tok1p-Mutanten auf Funktionalität	40
3.2.1	C- bzw. N-terminale-Deletionsmutanten	40
3.2.2	Tok1p-Aminosäure-Austauschmutanten	41
3.3	Auswirkungen der Mutationen auf die Selektivität des Kanalproteins Tok1p... 45	
3.4	Elektrophysiologische Charakterisierung von Tok1p.....	47
3.4.1	Abhängigkeit der Tok1p-Aktivierung von der Membranspannung und der externen Kaliumkonzentration.....	47
3.4.2	Abhängigkeit der Tok1p-Stromamplitude von der Haltespannung	50
3.4.3	Selektivität des Tok1p-Kanals.....	50
3.5	Funktion negativer Ladungen an der externen Porenöffnung.....	52
3.5.1	D292N-Mutante.....	52
3.5.2	D426N-Mutante.....	54
3.5.3	Mutante D292E	56
3.5.4	Analyse der Peak-Ströme	57
3.5.5	Aktivierungszeitkonstanten	59
3.6	Funktion von C- bzw. N-Terminus im Tok1p-Kanal	61
3.6.1	Mutante Δ C(K470Stop)	61
3.6.2	Mutante Δ C(L582Stop).....	63
3.6.3	Mutante Δ C(L674Stop).....	64
3.6.4	Abhängigkeit der Aktivierung der C-terminalen Deletionsmutanten von der Membranspannung	66
3.6.5	Bedeutung des N-Terminus für die Funktion von Tok1p.....	67
3.7	Auswirkungen von Mutationen in der Kaliumkanal-Signatursequenz GY(L)G. 67	
3.8	Simulation der Stromspuren	69
4.	Diskussion	73
4.1	Wachstumstests	73
4.2	Die Rolle von N-Terminus und C-Terminus bei der Kanalassemblierung.....	74
4.3	Bedeutung des C-Terminus für die Spannungsabhängigkeit und die Deaktivierungskinetik von Tok1p	75
4.4	Die Anordnung der beiden Porenloops GLGD vor GYGD ist für das Gating von Tok1p wichtig.....	78
4.5	Der externe Ring negativ geladener Aspartatseitenketten moduliert Gating und Permeation von Tok1p.....	80
4.6	Die Messungen der D \square N-Mutanten lassen sich durch ein kinetisches 3-Zustandsmodell beschreiben.....	87
5.	Zusammenfassung	89
6.	Literatur	91
7.	Anhang	99

1. Einleitung

1.1 Ionenkanäle

Alle lebenden Zellen sind von einer Membran umgeben. Diese Membranen grenzen zum einen den intrazellulären Reaktionsraum vom extrazellulären Milieu ab, vermitteln aber auch den kontrollierten Austausch von Materie, Energie und Information. Der kontrollierte Transport von Materie, insbesondere großer oder polarer Teilchen erfolgt mittels spezifischer Membranproteine. Ionenkanäle sind eine Klasse von integralen Membranproteinen, die den passiven Transport von Ionen über eine Membran bewerkstelligen. Sie erlauben einfache Elektrodifusion, die einzig durch den elektrochemischen Potenzialgradienten über der Membran angetrieben wird. Die meisten Ionenkanäle leiten nur eine Ionensorte. Die wichtigsten Ionenkanäle in biologischen Membranen sind Kalium-, Natrium-, Calcium-, und Chloridkanäle.

Ionenkanäle sind nicht immer offen. Sie können offen und somit elektrisch leitend oder geschlossen und nicht leitend sein, wobei spezielle Strukturen in diesen Proteinen als Tore („gates“) fungieren und den Transport der Ionen kontrollieren. Öffnen und Schließen dieser Tore („gating“) kann durch verschiedene Signale moduliert werden. Solche Signale können chemischer Art sein, wie bei ligandengesteuerten Ionenkanälen (Acetylcholin, Calcium, zyklische Nucleotide, ATP etc.) oder physikalischer Art, wie bei mechanosensitiven, lichtaktivierten oder spannungsgesteuerten Ionenkanälen. Spannungsgesteuerte Ionenkanäle spielen insbesondere in erregbaren Membranen beim Aktionspotenzial eine entscheidende Rolle. Während in tierischen Zellen das Aktionspotenzial auf die Aktivität von Natrium- und Kaliumkanälen zurückzuführen ist, sind dies bei Pflanzenzellen Chlorid- und Kaliumkanäle.

1.2 Strukturmerkmale spannungsabhängiger Kaliumkanäle

Kaliumkanäle findet man in nahezu allen Zellen. Anhand ihrer Strukturmerkmale können Kaliumkanäle in vier Hauptklassen eingeteilt werden. Nach Hydropathie-Plot-Analysen (Kyte und Doolittle, 1982) besitzen Kaliumkanäle vom „Shaker“-Typ eine Sekundärstruktur mit sechs Transmembranhelices (TM1-TM6) und einem hydrophoben Porenloop (P). Zu den Vertretern dieses Kanaltyps (6TM-1P) gehören spannungsabhängige Kaliumkanäle aus tierischen Zellen (z.B. Kv1 (Shaker)),

ligandengesteuerte Ionenkanäle (z.B. CngA1 („cyclic nucleotide-gated“)), sowie einwärts- und auswärtsgerichtete Kaliumkanäle aus Pflanzenzellen (KAT1, AKT1, SKOR). Die Vertreter der Kir-Kanäle („inward rectifying“) besitzen zwei hydrophobe Transmembrandomänen pro α -Untereinheit und einen Porenloop (2TM-1P). Zu dieser Klasse von Kaliumkanälen gehören überwiegend tierische Kanäle (Kir1.1, Ho et al. 1993; Kir2.1, Kubo et al. 1993), sowie ein pflanzlicher Vertreter (KCO3), der funktional allerdings noch nicht beschrieben wurde.

Sowohl bei den Kaliumkanälen vom Shaker-Typ als auch bei Kir-Kanälen bilden vier α -Untereinheiten einen funktionalen Kanal, wobei die vier Porenloops im Zentrum des Kanalkomplexes die wassergefüllte Pore für den Ionentransport bilden (Li et al, 1994).

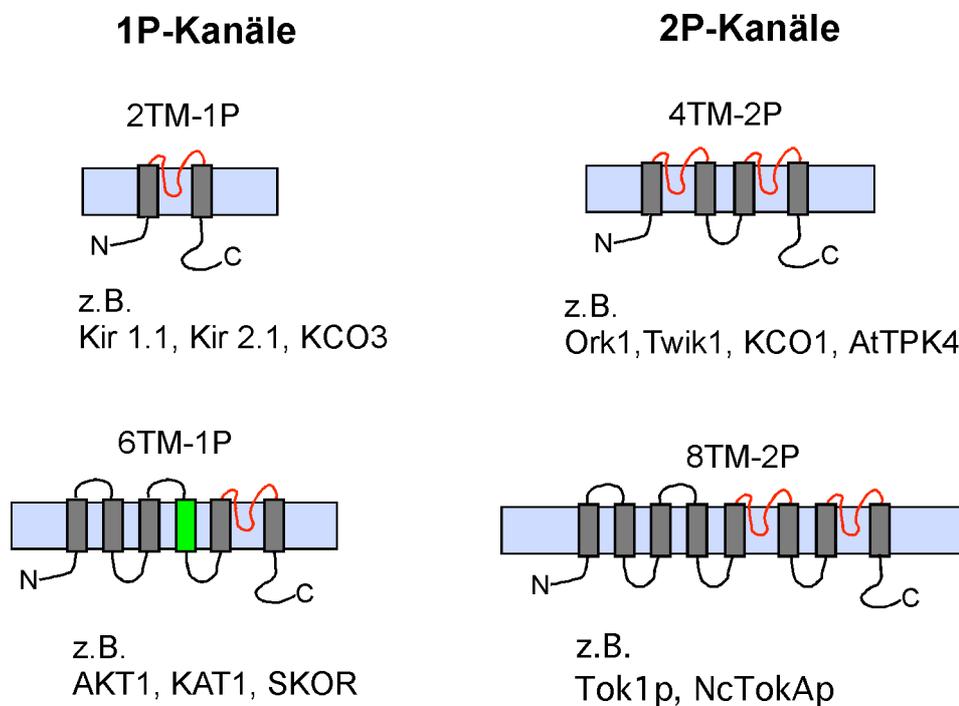


Abbildung 1.1 Strukturmerkmale der kanalbildenden Untereinheiten von Kaliumkanälen. Der Spannungssensor (TM4) wird durch ein grünes Rechteck, die Porendomänen als rote Loops dargestellt. N bzw. C symbolisieren das aminoterminalen bzw. das carboxyterminale Ende des Kanalproteins und befinden sich auf der cytoplasmatischen Seite. Nähere Erläuterungen im Text.

Neben diesen Kaliumkanälen mit einem Porenloop pro α -Untereinheit existieren auch Kaliumkanalproteine mit zwei Porenloops, sogenannte 2-P Kanäle.

Die tierischen und pflanzlichen Vertreter dieser Kanalklasse weisen vier Transmembranhelices und zwei Porenloops auf (Ork1, Goldstein et al. 1996; Twik1, Lesage et al. 1996b; KCO1, Czempinski et al, 1996, AtTPK4(KCO4), Becker et al.,

2004). Varianten dieser 4TM-2P Kanalarchitektur, die sich durch das Vorhandensein von acht Transmembranhelices und zwei Porenloops auszeichnen (8TM+2P), finden sich in Pilzen. Der erste Kaliumkanal mit einer 8TM-2P Struktur, Tok1p, konnte in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden (Ketchum et al., 1995) und als dominierender Kaliumkanal in der Plasmamembran identifiziert werden (Duk1p von Reid et al., 1996; unter York1p von Lesage et al., 1996a, unter Ykc1p von Zhou et al., 1995, unter J0911 von Andre´ et al., 1995).

Im filamentösen Pilz *Neurospora crassa* wurde ein Gen entdeckt (NcTOKA), das sehr starke Homologie zu TOK1 aufweist. Das NcTOKA-Genprodukt konnte nach Expression in *S. cerevisiae* und elektrophysiologischer Analyse auch als spannungsabhängiger Kaliumkanal beschrieben werden (Roberts, 2003).

1.2.1 Selektive Permeabilität

Kaliumkanäle besitzen trotz großer Selektivität für Kaliumionen eine sehr hohe Durchsatzrate (10^6 - 10^8 Ionen/Sekunde). Wie diese beiden gegensätzlichen Eigenschaften in Kaliumkanälen vereinbar sind, wurde anhand des Kaliumkanals KcsA aus *Streptomyces lividans* aufgeklärt (Doyle et al., 1998; Zhou und MacKinnon, 2003).

Shak	D A F W W A V V T M T T V G Y G D M T
AKT1	T S M Y W S I T T L T T V G Y G D L H
KAT1	T A L Y W S I T T L T T T G Y G D F H
Kir2.1	A A F L F S I E T Q T T I G Y G F R C
KcsA	R A L W W S V E T A T T V G Y G D L Y
Tok1 P1	N A L Y F C T V S L L T V G L G D I L
Tok1 P2	N C I Y F C F L C L L T I G Y G D Y A
Twik1 P1	S A L F F A S T V L S T T G Y G H T V
Twik1 P2	E S F Y F C F I S L S T I G L G D Y V

Abbildung 1.2 Sequenz-Alignment der Porenregion unterschiedlicher Kaliumkanäle, wobei die Übereinstimmung mit der Kaliumkanal-Signatursequenz nach Heginbotham (1994) rot und fett hervorgehoben ist.

Kaliumkanal- α -Untereinheiten besitzen in der Porenregion eine Signatursequenz von acht Aminosäuren (TXXTXGYG), die sowohl in den spannungsabhängigen Kaliumkanälen vom Shaker-Typ, als auch in den Kaliumkanälen vom Kir-Typ

vorliegen. Diese hochkonservierte Region wird für die Selektivität der Kaliumkanäle verantwortlich gemacht und ist in allen bisher untersuchten Kaliumkanälen vorhanden. Auch wenn ein Gesamt-Sequenzvergleich zwischen Kanälen der selben Klasse oft eine geringe Sequenzübereinstimmung aufweist, so ist die Übereinstimmung in der Kaliumkanal-Signatursequenz immer sehr hoch (Heginbotham et al., 1994) (Abb.1.2).

Am KcsA-Kanal von *Streptomyces lividans* ist der strukturelle Aufbau des Kanalproteins und insbesondere des Porenbereichs am besten untersucht (Doyle et al., 1998; Zhou Y., MacKinnon R., 2003).

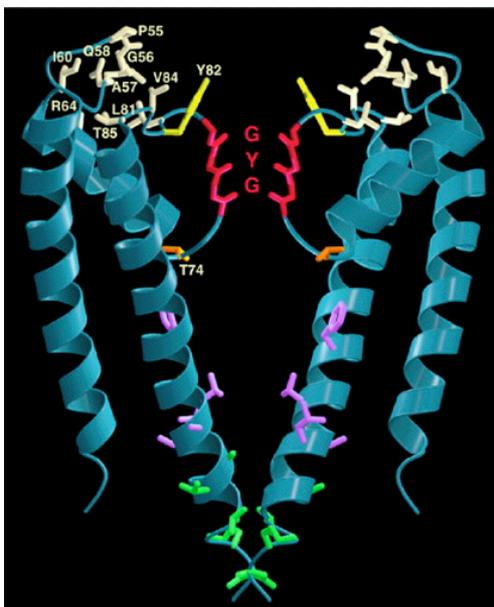


Abbildung 1.3 Struktur-Modell des KcsA Kanals aus *Streptomyces lividans*. Dargestellt sind nur 2 Untereinheiten (blau) des als Tetramer vorliegenden Kanals, der strukturell ein 2-Transmembrandomänen-Kanal ist. Das GYG-Motiv des Kalium-Selektivitätsfilters ist rot dargestellt. Mutationen in diesem Bereich zerstören die Kaliumselektivität des Kanals. Mutationen des Tyrosin 82 (gelb) und des Threonins 74 (orange) verändern die Sensitivität des Kanals für TEA. (Doyle et al., 1998)

Nach Doyle trägt die Aminosäure Tyrosin (Y78) zur engsten Stelle der Kanalpore, dem Selektivitätsfilter, bei. Dieser wird durch die Carbonylgruppen der Tyrosine (Y) gebildet, die dazu beitragen den Kaliumionen ihre Hydrathülle abzustreifen bevor sie die Pore durchqueren können (Doyle et al., 1998). Inzwischen wurde über Röntgen-Strukturanalysen des KcsA-Kanals festgestellt, dass im Selektivitätsfilter vier diskrete Kaliumbindestellen vorhanden sind (Zhou,Y., MacKinnon, R., 2003) (Abb.1.4). Jede Kaliumbindestelle wird von acht Carbonyl-Sauerstoffatomen umgeben, die vom Peptidgrundgerüst der TVGY-Sequenz des Selektivitätsfilters und der Seitenkette des Treonins stammen. Diese Koordination der Kaliumionen im Selektivitätsfilter über die Carbonyl-Sauerstoffatome des Peptidgrundgerüsts ist eine wichtige Voraussetzung zur Aufrechterhaltung der Filterstruktur. Weiterhin konnten

MacKinnon und Zhou nachweisen, dass immer zwei Kaliumionen in spezifischer Konfiguration im Selektivitätsfilter binden, entweder in der 1-3-Konfiguration (K^+ -H₂O- K^+ -H₂O) oder der 2-4-Konfiguration (H₂O- K^+ -H₂O- K^+).

Diese Kette von K^+ und H₂O bildet auch das eigentlich zu „transportierende Substrat“. Während die beiden Kaliumionen getrennt durch ein Wassermolekül zwischen der Konfiguration 1-3 und 2-4 oszillieren, dringt ein weiteres Kaliumion in die Pore ein und schiebt die K^+ -H₂O- K^+ -H₂O-Kette weiter, so dass auf der entgegengesetzten Seite ein Kaliumion die Pore verlässt.

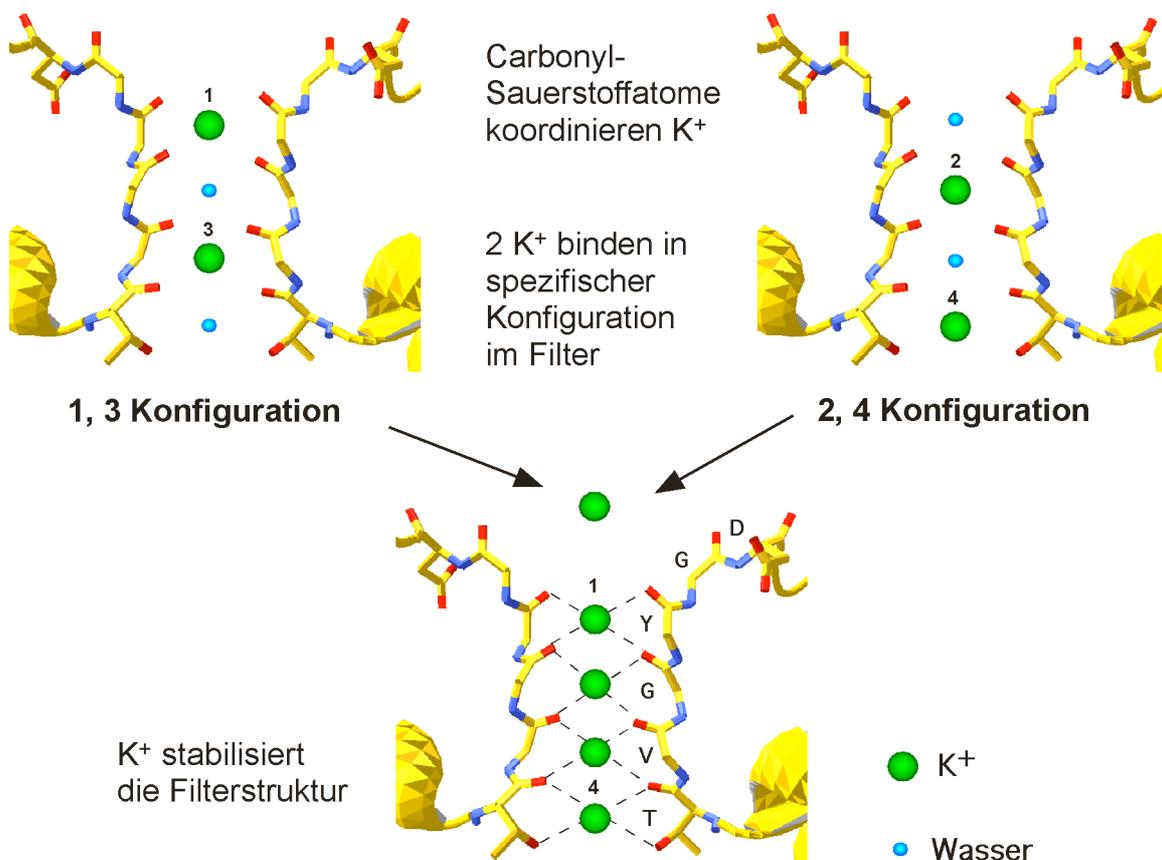


Abbildung 1.4 „Filter-Stabilisierungs-Modell“. Kaliumionen binden im Selektivitätsfilter von Kaliumkanälen in der 1,3-Konfiguration und in der 2,4-Konfiguration. Die Bindung der Kaliumionen ist für die Aufrechterhaltung der Filterstruktur notwendig (nach MacKinnon, Nobelvortrag 2003, modifiziert).

Eine Erklärung für die hohe Leitfähigkeit bei gleichzeitiger Selektivität eines Kanals ist die elektrostatische Abstoßung zwischen den Kaliumionen. Dieser Mechanismus wurde schon 1979 von Hille und Schwarz aufgrund elektrophysiologischer Messungen postuliert. MacKinnon und Zhou sehen in der ionenabhängigen

Konformationsänderung im Selektivitätsfilter einen zusätzlichen Mechanismus der die hohe Leitfähigkeit eines selektiven Kanalproteins erklären kann (Zhou, Y., MacKinnon, R., 2003).

1.2.2 Kanalassemblierung

Bei tierischen Shaker-Kanälen ist die Tetramerisierung homologer oder heterologer α -Untereinheiten die Voraussetzung zur Bildung funktionaler Kanäle. Im Prozess der Kanalassemblierung spielt eine hochkonservierte T1-Domäne, die im N-Terminus lokalisiert ist, eine sehr wichtige Rolle (Li et al., 1992). Die absolute Notwendigkeit dieser T1-Tetramerisierungsdomäne wird jedoch sehr umstritten diskutiert. Zerangue et al. vertreten die Ansicht, dass die T1-Domäne die spezifische Kanalassemblierung der Kanaluntereinheiten verschiedener Unterfamilien unterstützt, aber für die nachfolgenden Schritte der Assemblierung und der Proteinfaltung nicht notwendig ist (Zerangue et al., 2000). Sie konnten zeigen, dass ShB-Untereinheiten auch ohne T1-Domäne funktionale Kanäle bilden. Im Artikel von C. Strang (2001) wird jedoch darauf hingewiesen, dass die T1-Domäne eine sehr wichtige Funktion in der Kanalassemblierung spielt und auch in den funktionalen Kanal integriert wird.

Bei pflanzlichen Kaliumkanälen, wie zum Beispiel dem AKT1, geht man hingegen davon aus, dass der C-Terminus maßgeblich an der Tetramerisierung des Kanalproteins beteiligt ist (Daram, 1997). Durch elektrophysiologische Untersuchungen C-terminaler Deletionsmutanten des pflanzlichen Kaliumkanals KAT1 zeigten Marten und Hoshi (1997) jedoch, dass der C-Terminus nicht zur Assemblierung funktionaler Kanalproteine beiträgt.

Dreyer et al. (2004) zeigten, dass in pflanzlichen Kalium-Auswärtsrektifizierern zwei unterschiedliche Domänen im cytoplasmatischen C-Terminus für die Kanalassemblierung notwendig sind.

Also auch bei pflanzlichen Kanälen ist man noch weit davon entfernt, die mechanistischen Zusammenhänge der Kanalassemblierung zu verstehen.

Für die Bildung eines funktionalen Dimers des 2P-Kanals Twik1 wurde eine Selbstassemblierung und eine Verbindung der zwei kanalbildenden Untereinheiten über Disulfidbrücken postuliert. Dazu ist ein Cystein an Position 69 und die Aminosäuresequenz des Twik1p von R57 bis V90 unerlässlich. Nach Mutation des

Cysteins 69 zu Serin ist keine Expression funktionaler Twik1-Kanäle mehr möglich (Lesage et al, 1996c).

Zur Kanalassemblierung des Tok1p-Kanals in *S. cerevisiae* ist bisher nichts bekannt.

1.2.3 Aktivierung/Inaktivierung

Die Aktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle resultiert aus einer spannungsabhängigen Konformationsänderung im Kanalprotein, die zur Öffnung der Kanalpore führt. Die Kopplung der Spannungsabhängigkeit mit der Porenöffnung erfolgt über Transmembranhelices TM1 bis TM4. Dabei übernehmen die positiv geladenen Aminosäureseitenketten (oft Arginine) in Transmembrandomäne 4 die Aufgabe, die ansonsten hydrophobe TM4 durch die Membran zu bewegen. Die Frage, wie diese Bewegung von TM4 durch die Membran aussieht, wird noch kontrovers diskutiert. Es werden drei Modelle diskutiert. Im ursprünglichen Modell bewegt sich TM4 gleitend oder schraubend durch die Membran nach außen (Yang et al., 1996). Im Paddelmodell geht man davon aus, dass sich TM4 mit einem Teil der TM3 als alphahelikale Haarnadel (helix-turn-helix) durch die Membran bewegt (Jiang et al., 2003). Das neueste Modell sieht vor, dass sich der Hauptteil des Kanalproteins vermutlich durch Rotation relativ zur TM4 verschiebt (Starace und Bezanilla, 2004).

Spannungsabhängige Kaliumkanäle zeigen hauptsächlich zwei Formen der Inaktivierung, eine schnelle und eine langsame. Die beiden Formen der Inaktivierung laufen über zwei völlig unterschiedliche Mechanismen ab. Die schnelle N-Typ Inaktivierung verläuft über einen Verschluss der Porenöffnung auf der cytoplasmatischen Seite durch einen Teil des N-terminalen Endes des Kanalproteins. Dieser N-Typ-Inaktivierungsmechanismus ist auch als „Ball and Chain“-Modell bekannt, da die ersten 22 Aminosäuren des N-Terminus den Blockierungspartikel („ball“) bilden, der über die Aminosäuren 23 bis 83 als eine Art Kette („chain“) am Kanalprotein befestigt ist (Hoshi et al., 1990, Zagotta et al., 1990).

Die langsamere C-Typ-Inaktivierung wurde zuerst an Mutanten des Shaker-Kanals beschrieben, bei denen die N-terminale Inaktivierungsdomäne deletiert worden war (Hoshi et al., 1991).

Es wurde postuliert, dass bei der C-Typ-Inaktivierung eine Konformationsänderung in der äußeren Porenregion auftritt, die zur Verengung und dadurch zum Verschluss der Pore führt (Liu et al., 1996).

Externes Kalium und andere kleine Kationen können die C-Typ-Inaktivierung modulieren. So wurde gezeigt, dass die C-Typ-Inaktivierung bei Shaker-Kanälen durch externes Tetraethylammonium (TEA) (MacKinnon und Yellen, 1990; Heginbotham und MacKinnon, 1992) und erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentrationen reduziert werden kann (Pardo et al., 1992). Interne Kaliumkanalblocker erhöhen die C-Typ-Inaktivierungs-Rate im gleichen Ausmaß wie sie den Kaliumefflux verhindern (Baukrowitz und Yellen, 1996).

Durch Levy und Deutsch (1996) konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der externen Kaliumkonzentration die Rückkehr der Kanäle aus der C-Typ-Inaktivierung durch spannungsabhängige Bindung von Kalium an eine extrazelluläre Bindestelle beschleunigt. Lange Zeit wurde vermutet, dass die Bindung von TEA oder Kaliumionen direkt im Anschluss an den Selektivitätsfilter eine Konformationsänderung und damit auch die C-Typ-Inaktivierung verhindert.

Inzwischen gibt es eine Reihe von Hinweisen, dass der Selektivitätsfilter selbst das Inaktivierungstor für die C-Typ-Inaktivierung darstellt (Kiss et al., 1999; Eghbali et al., 2002; Molina et al., 1997 und 1998; Zhou et al., 2001; Zhou und MacKinnon, 2003). All diese Ergebnisse zeigen, dass Kaliumkanäle externes Kalium zur ungestörten Funktion benötigen und eine Absenkung des externen Kaliums zu einer erhöhten C-Typ-Inaktivierung durch Auftreten eines partiellen Porenkollapses führt.

In den meisten Kaliumkanälen findet man in unmittelbarer Nachbarschaft zum GYG-Motiv im Porenloop eine negativ geladene Aminosäure (Asparaginsäure, D). Der Kaliumkanal Herg1 aus menschlichen Herzmuskelzellen hat an dieser Position eine neutrale Aminosäure (Asparagin, N) und zeigt auch ohne N-terminale Inaktivierungsdomäne eine schnelle Inaktivierung.

Einführung einer negativen Ladung an Position 629 durch Mutagenese des Asparagins (N) zu Asparaginsäure (D) hat einen Verlust der C-Typ-Inaktivierung und einen Verlust der Kationenselektivität zur Folge (Lees-Miller et al. 2000). Eine Beteiligung der hochkonservierten Asparaginsäuren D292 an der Modulation der Kaliumleitfähigkeit wurde auch am tierischen BK_{Ca}-Kanal postuliert (Haug et al., 2004a, 2004b). Die negative Ladung der Asparaginsäure-Seitenkette soll zur

Akkumulation von Kaliumionen in der äußeren Porenregion nahe des Selektivitätsfilters führen und dadurch den Offenzustand des Kanalproteins stabilisieren. Mutation der äquivalenten Asparaginsäure in Homo-Tetrameren von Shaker-Kanälen führt zu nichtfunktionalen Kanälen.

1.3 Tok1p ein spannungsabhängiger Kaliumkanal im Plasmalemma von *Saccharomyces cerevisiae*

1.3.1 Identifizierung

Saccharomyces cerevisiae besitzt in der Plasmamembran einen auswärtsgerichtenden, spannungsabhängigen Kaliumkanal, der zuerst von Gustin et al. (1986) elektrophysiologisch nachgewiesen werden konnte. Dieser langsam aktivierende Kaliumkanal wurde von Bertl et al. auf funktionaler Ebene mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik weiter charakterisiert (Bertl et al., 1992, 1993, 1998, a). Im Rahmen der systematischen Sequenzierung des Hefegenoms wurde eine Sequenz (J0911; YJL093c) identifiziert, deren Genprodukt die für Kaliumkanäle typische Signatursequenz GYGD aufwies. Das YJL093c Genprodukt induzierte in *Xenopus*-Oocyten spannungsabhängige, langsam aktivierende Kaliumströme (Ketchum et al., 1995; Zhou et al., 1995; Reid et al., 1996).

Deletion von YJL093c in *S. cerevisiae* führte zum völligen Verlust des langsam aktivierenden Kaliumauswärtsstroms im Plasmalemma von Hefe. Dies zeigte eindeutig, dass die beobachtete Kanalaktivität im Plasmalemma von *S. cerevisiae* auf das YJL093c Genprodukt (Tok1p) zurückzuführen ist. Die heute übliche Bezeichnung für den Kaliumkanal im Plasmalemma von *S. cerevisiae* ist Tok1p (**T**andem Pore **O**utward Rectifying **K**⁺ Channel **1**).

1.3.2 Struktur

Mit der Klonierung des Tok1p-Kanals aus *S. cerevisiae* wurde eine neue Familie der spannungsabhängigen Kanäle entdeckt. Tok1p unterscheidet sich vor allem dadurch deutlich von den Kanälen des Shaker-Typs und den Kir-Kanälen, dass er zwei Porenloop-Domänen pro Untereinheit besitzt (Abbildung 1.5).

Ein weiterer Unterschied zu den Shaker-Typ- und Kir-Kanälen findet sich in der Anzahl der vermuteten Transmembranhelices von Tok1p. Nach Hydrophathie-Plot-Analysen (Kyte und Doolittle) besitzt Tok1p acht hydrophobe Transmembranhelices,

deren Länge die zur Durchquerung der Membran notwendigen 20 Aminosäuren übersteigt.

Kanalbildende Untereinheit

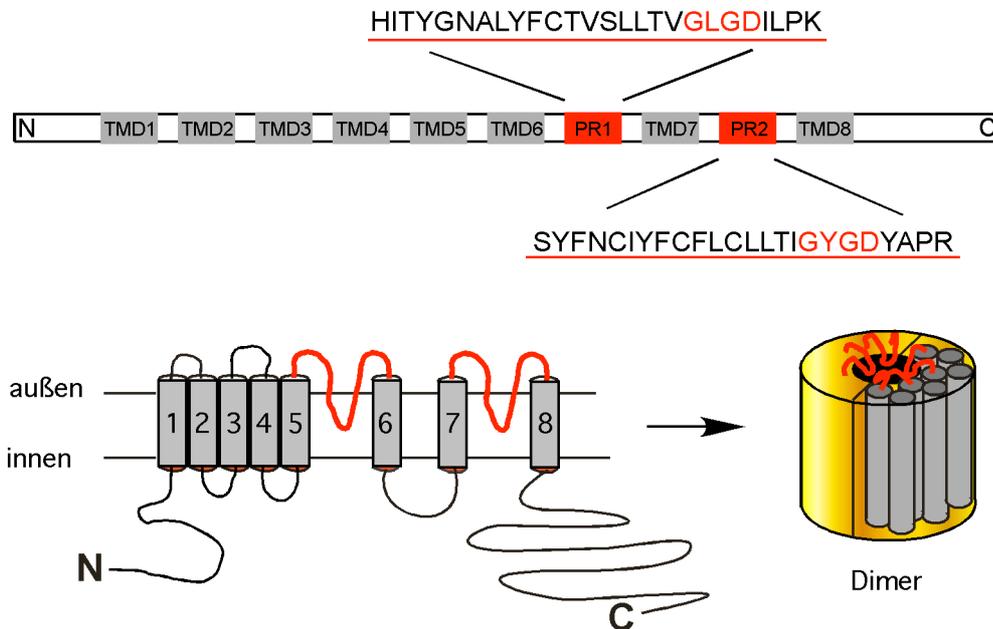


Abbildung 1.5 Kanalbildende Untereinheit des Tok1p-Kanals mit 8 Transmembrandomänen (TMD) und Zwei Porenloops. Die Porenregionen (PR) sind im Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren angegeben (siehe Anhang) und die für Kaliumkanäle charakteristischen GYGD-Motive sind rot hervorgehoben. Vermutete Anordnung der Transmembrandomänen in der Plasmamembran und möglicher Aufbau eines Dimers als funktionalem Kanal (unten). N und C symbolisieren das aminotermiale- bzw. das carboxyterminale Ende des Kanalproteins und befinden sich auf der cytoplasmatischen Seite.

1.3.3 Funktionale Domänen

Die Expression des ORF-*TOK1* liefert in vivo ein 77kD-Protein, das aus 691 Aminosäuren besteht und zwei für Kaliumkanäle charakteristische Signatursequenzen in Reihe aufweist (YPD Protein Report für Tok1p).

Die Signatursequenzen der beiden Porenloops zeigen große Übereinstimmung zu der charakteristischen Kaliumkanal-Signatursequenz (Heginbotham et al.,1994). Die auftretende Abweichung im Signaturmotiv des ersten Porenloops (hier GLG) hat auf die Kaliumselektivität offensichtlich keinen negativen Einfluss.

Mutageneseversuche belegen, dass die Anordnung der beiden Signatursequenzen im Tok1p-Kanal nicht austauschbar ist (Lesage et al.,1996). So führten sowohl Mutationen, die das Leucin(L) im 1. Porenloop gegen Tyrosin(Y), als auch Mutationen, die das Y des 2. Porenloops gegen L austauschten, bei Expression in

Xenopus-Oozyten zur Bildung nichtfunktionaler Kanäle. Die Doppelmutation, bei der nur die Lage der GLG- bzw. GYG-Motive vertauscht wurde, war in Oozyten ebenfalls nichtfunktional. Daher wurde vermutet, dass das Vorhandensein der beiden GLG-Motive im Kanal und deren Lage im Gesamtprotein für die Funktion sehr wichtig sind. Da bisher keine homologe Expression dieser L¹Y-Mutanten in Hefezellen durchgeführt wurde, war es von Interesse, ob unter homologen Bedingungen die Funktionalität der mutierten Tok1p-Kanäle ebenfalls gestört ist.

Über den Einbau des Kanalproteins in die Membran ist noch recht wenig bekannt, außer, dass Tok1p keine spezifische Signalerkennungssequenz am N-Terminus für die cotranslationale Translokation des Proteins aufweist.



Abbildung 1.6 Aminosäuresequenz des Tok1p mit möglichen funktionalen Strukturdomänen. S1-S8 mögliche Transmembranhelices, P1 und P2 vermutete Porenloops mit den Signatursequenzen GLG und GYG, mögliche N-Glycosylierungsstellen und Phosphorylierungsstellen für i) Protein-Kinase C (PKC) ii) Protein-Kinase A (PKA) und iii) die Tyrosin-Kinase. Die Abbildung wurde nach Angaben eines ExPASy ScanProsite von TOK1-YEAST (P40310) erstellt.

An zwei exponierten extrazellulären Aminosäureabschnitten besitzt Tok1p drei mögliche N-Glycosylierungsstellen (Abb.1.6).

Obwohl Tok1p spannungsabhängig ist, weist seine Sequenz keine Region auf, die dem TM4-Spannungssensor homolog wäre. Aber auch bei Kir-Kanälen ist keine direkte Homologie zur TM4-Helix bekannt. In diesen Kanälen existiert jedoch eine MO Region (Ho et al., 1993), die ebenfalls eine Ansammlung geladener Aminosäureseitenketten aufweist und so eventuell die Funktion des Spannungssensors übernehmen kann (Terlau, H., Stühmer, W., 1998; Nichols, C.G., Lopatin, A.N., 1997; André, B., 1995; Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1997).

1.3.4 Mögliche Regulationsdomänen

Über mögliche Regulationsmechanismen von Tok1p ist noch wenig bekannt. In der AS-Sequenz findet man neben acht möglichen Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C auch eine mögliche Phosphorylierungsstelle für Proteinkinase A (Abb.1.6). Die Akkumulation vier solcher PKC-Phosphorylierungsstellen im cytoplasmatischen Loop zwischen TM6 und TM7 gibt Anlass, diesen Bereich als Regulationsdomäne anzusehen, die über Phosphorylierung/Dephosphorylierung gesteuert ist. Außerdem sind zehn mögliche Phosphorylierungsstellen für Casein-Kinase II und zwei für Tyrosinkinase in der Proteinsequenz des Kanals enthalten (ExPASy).

Im elektrophysiologischen Experiment konnte nachgewiesen werden, dass die Tok1p-Aktivität von der intrazellulären ATP-Konzentration abhängig ist. So kommt es bei Ganzzelleableitungen von Tok1p ohne ATP in der Pipettenlösung zu einem „rundown“ des Kanals. Ein potenzielles ATP-Bindemotiv GYKLGKYPPTFNLL liegt zwischen TM4 und TM5 vor (Bertl et al., 1998, a).

In Hefen wird bei osmotischem Stress die Hog1p MAP Kinase aktiviert. Diese phosphoryliert als Antwort auf osmotischen Stress unter anderem zwei in der Plasmamembran lokalisierte Proteine, den Nha1p (Na⁺/H⁺-Antiporter) und den Kalium-Auswärtsgleichrichter Tok1p (Proft 2004). Durch in vitro-Experimente konnte nachgewiesen werden, dass Hog1p MAPK die C-terminale Region von Nha1p und Tok1p phosphoryliert und im Fall von Nha1p den Transporter auch aktiviert. Ob es durch Hog1p vermittelte Phosphorylierung auch zu einer Aktivierung von Tok1p kommt, ist noch nicht geklärt.

Sit 4p ist eine Serin/Threonin Protein-Phosphatase in Hefe. Eine Überexpression von SIT4 in *S. cerevisiae* führt zu einer erhöhten Lithium-Toleranz der Zellen. Die SIT4-Transkription wird bereits durch niedrige Lithium-Konzentrationen in einer zeitabhängigen Weise induziert. Auch Natrium und Kalium induzieren in hohen Konzentrationen die Transkription von SIT4, und die Hefezellen erniedrigen als Antwort auf einen Li^+ oder Na^+ -Stress ihren intrazellulären Kaliumgehalt. Dies deutet darauf hin, dass an der Regulation des Ionenhaushalts durch Sit4p ein Kalium-Efflux-Transportsystem beteiligt ist. Welche der in *S. cerevisiae* in Frage kommenden Transportsysteme für den Sit4p-vermittelten K^+ -Efflux verantwortlich sind, ist noch nicht geklärt. Neben den beiden H^+ -Antiportern Nha1p und Kha1p könnte auch der K^+ -Auswärtsgleichrichter Tok1p für den K^+ -Efflux in Frage kommen (Masuda et al., 2000).

1.3.5 pH-Abhängigkeit von Tok1p

In elektrophysiologischen Experimenten konnte festgestellt werden, dass Tok1p recht unempfindlich auf externe pH-Veränderungen reagiert, aber stark inhibiert wird wenn das intrazelluläre pH absinkt. Dieser inhibierende Effekt der intrazellulären Ansäuerung auf die Aktivität des Kanals wird in Zusammenhang mit zehn im Cytoplasma lokalisierten Histidinseitenketten gebracht, da Histidin die einzige Aminosäure ist, deren pK_s -Wert des Seitenketten-Imidazolrings mit 6,1 im physiologisch relevanten pH-Bereich liegt. Diese beiden Faktoren, sowohl die intrazelluläre pH-Abhängigkeit, als auch die ATP-Abhängigkeit, könnten eine Verbindung zwischen der Tok1p-Kanalaktivität und der Stoffwechsellage der Hefezelle darstellen (Bertl et al., 1998, a).

1.3.6 Modulation des Schaltverhaltens

Auffällig an der Struktur des Kanals ist der extrem lange C-Terminus aus 235 Aminosäuren, an dem viele Cluster von basischen Aminosäuren und vereinzelt sauren Aminosäuren zu finden sind. Solche Anordnungen sind von der N-Typ-Inaktivierung bei spannungsabhängigen Kaliumkanälen bekannt.

Im Hinblick auf das Gating des Tok1p ist noch eine andere Region des Kanalproteins interessant. Der cytoplasmatische Loop zwischen TM6 und TM7 ist äußerst reich an basischen Aminosäuren. Zusätzlich zu den basischen Aminosäuren enthält diese

Region eine große Anzahl an Phosphorylierungsstellen, wie man sie in den regulatorischen Domänen von CFTR-Proteinen findet. In diesen CFTR's (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) ist der „ball“ des „Ball and Chain“ Modells gewissermaßen in die Aminosäurekette eingebaut und dient in dem Chloridtransporter als sogenannte „Schlüsselsicherung“. Das bedeutet, dass die Phosphorylierung dieser regulatorischen Domäne für die Freigabe der Kanalpore notwendig, aber für die Öffnung des Chloridkanals noch nicht ausreichend ist (Terlau & Stühmer, 1998; Dörk & Stuhmann 1996).

1.3.7 Elektrophysiologische Charakterisierung

Tok1p ist von vielen Faktoren modulierbar. So ist er von der Membranspannung, von der extrazellulären Kaliumkonzentration, von der intrazellulären Calciumkonzentration und vom cytoplasmatischen pH abhängig.

Bei positiven Spannungen um 100mV und hohen extrazellulären Kaliumkonzentrationen zeigt Tok1p bei Patch-Clamp-Messungen im Wildtyp eine langsame Aktivierung und eine schwache Inaktivierung. Eine Absenkung der extrazellulären Kaliumkonzentration führt zu einer Verschiebung der Strom-Spannungs-Kurve (IV-Kurve) zu negativeren Spannungen, während eine Absenkung des cytoplasmatischen Kaliums zu einer Verschiebung der IV-Kurve zu positiveren Spannungen führt. Somit kann Kalium beim Tok1p-Kanal nicht nur als Substrat, sondern auch als Ligand eine regulatorische Funktion übernehmen (Bertl et al., 1998, a).

Die Verschiebung der IV-Kurve zu negativeren Spannungen kann beim Austausch der extrazellulären Kaliumionen gegen Ionen wie Rubidium oder Cäsium nicht beobachtet werden. Das deutet darauf hin, dass Tok1p zwischen Kalium, Rubidium und Cäsium als Gatingpartikel nicht unterscheiden kann.

Beim Austausch des extrazellulären Kaliums gegen Natrium werden folgende Effekte erkennbar: i.) Verschiebung der IV-Kurve zu negativeren Spannungen vergleichbar dem Effekt bei Absenkung der Kaliumkonzentration im Außenmedium ii.) Blockierung der Pore des Tok1p durch cytoplasmatisches Natrium und damit Blockierung der K⁺-Auswärtsströme durch den Kanal (Bertl et al., 1998, a). Diese Verschiebung der IV-Kurve und die Blockierung durch Natrium zeigt die hohe Selektivität des Tok1p-Kanals für Kalium gegenüber Natrium auf.

Tok1p wird wie die meisten Kaliumkanäle ebenfalls von extrazellulärem Barium und Tetraethylammonium (TEA) blockiert.

1.4 Kaliumhaushalt von *S. cerevisiae*

Die Kaliumaufnahme in Hefe beruht hauptsächlich auf den in der Plasmamembran lokalisierten Trk1p- und Trk2p-Kaliumaufnahmesystemen und dem nicht selektiven Kationen-Kanal Nsc1p (Bertl et al., 1993, 1998, a; Bihler et al., 1998). Als dominierender Kalium-Efflux-Kanal in *S. cerevisiae* konnte über elektrophysiologische und molekularbiologische Untersuchungen Tok1p identifiziert werden. Tok1p wird die Funktion der Turgorkontrolle und des Ladungsausgleichs während der protonengekoppelten Molekülaufnahme zugewiesen (Gustin et al., 1986; Bertl et al., 1993).

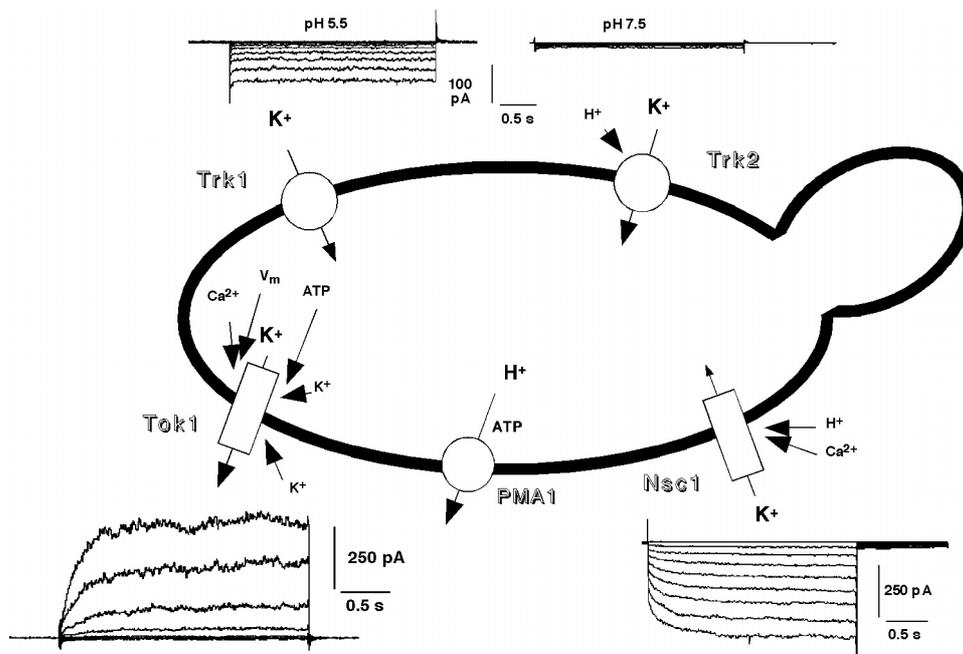


Abbildung 1.7 Schematische Darstellung der hauptsächlich am Kalium-Ionenhaushalt beteiligten Transportsysteme. Dargestellt sind auch die für sie charakteristischen Stromkurven und ihre Modulationsmöglichkeiten. Näheres siehe Text.

Die Aktivität der Plasmamembran H^+ -ATPase Pma1p führt zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran. Dadurch wird es Hefezellen ermöglicht, auch auf Kaliummangelmedium hohe intrazelluläre Konzentrationen an Kalium aufrechtzuerhalten. Die durch die H^+ -ATPase aufgebaute "proton motive force" (pmf) ist ein Maß für die freie Energie, die in einer elektrochemischen Potenzialdifferenz für H^+ über einer Membran gespeichert werden kann. Beim Transport von Protonen wird gleichzeitig auch eine positive Ladung über die Membran transportiert. Somit setzt

sich die Protonen-Motorische-Kraft aus einer chemischen und einer elektrischen Komponente zusammen. Die dabei entstehende Membranspannung erreicht Werte um -200mV . Der Aufbau eines Protonengradienten verbunden mit dem Aufbau eines elektrischen Potentials über der Plasmamembran, ermöglicht den Zellen Kalium in hohen Konzentrationen zu akkumulieren.

Hefen sind in der Lage, auf Medien mit Natriumkonzentrationen im molaren Bereich zu wachsen. Dies hängt mit dem sehr effizienten Natriumexport-System Nha1p im Plasmalemma von Hefen zusammen, das den Efflux von Natrium und Kalium im Austausch gegen Protonen ermöglicht. Weiterhin existiert noch ein möglicher K^+/H^+ -Antiporter Kha1p in Hefen, der eine wichtige Rolle bei der Salztoleranz einnimmt (YPD Protein Report für KHA1 und NHA1). Über die Lokalisation dieses K^+/H^+ -Antiporters Kha1p in der Plasmamembran oder im Tonoplasten wird noch kontrovers diskutiert (Maresova und Sychrova, 2005). Ein komplexes Zusammenwirken der beiden Trkp-Aufnahmesysteme, des Nsc1p, des Kalium-Effluxkanals Tok1p und der beiden Antiporter Nha1p und Kha1p, könnte einen Kontrollmechanismus für das intrazelluläre pH und den Kaliumgehalt in Hefen darstellen (Rodriguez-Navarro, 2000). Eine Beteiligung der Transporter Nha1p und Kha1p an der Kaliumaufnahme kann nicht ausgeschlossen werden.

1.4.1 Kaliumabhängiges Wachstum als Funktion von Trk1p, Trk2p und Tok1p

Das hochaffine Kaliumaufnahmesystem Trk1p und das mittelaffine Trk2p-System ermöglichen Hefen ein Wachstum bei Kaliumkonzentrationen im μM -Bereich. Eine Deletion der beiden Gene *TRK1* und *TRK2* generiert eine *trk1* Δ *trk2* Δ -Doppeldelentionsmutante, die nicht mehr in der Lage ist, bei millimolaren Kaliumkonzentrationen zu wachsen. Eine zusätzliche Deletion des *TOK1*-Gens der *trk1* Δ *trk2* Δ -Doppeldelentionsmutante hat keine Auswirkungen auf den beobachteten Wachstumsphänotyp (Abb.3.1). Der Wachstumsphänotyp der *trk1* Δ *trk2* Δ -Mutante kann jedoch durch Überexpression des Tok1p unterdrückt werden.

Das bei millimolaren Kaliumkonzentrationen fehlende Wachstum der *trk1* Δ *trk2* Δ -Mutante kann auch durch Absenkung der Konzentration an divalenten Kationen im Medium teilweise wieder hergestellt werden. Dieses Trk-unabhängige Wachstum der *trk1* Δ *trk2* Δ -Mutante ist von der Aktivität des unspezifischen Kationenkanals Nsc1p abhängig. Da die Aktivität von Nsc1p bei niederen Ca^{2+} -Konzentrationen stark erhöht wird, ist anzunehmen, dass die Restitution des Wachstums der *trk1* Δ *trk2* Δ -

Doppeldeletionsmutante bei mikromolaren Calciumkonzentrationen auf die Aktivierung des Nsc1p zurückzuführen ist (Bihler et al., 1998).

1.5 *Saccharomyces cerevisiae* als eukaryotischer Modellorganismus zur Struktur-/Funktionsanalyse von K⁺-Kanälen

Die vollständige Sequenzierung ihres Genoms macht *S. cerevisiae* zu einem in der Zell- und Molekularbiologie häufig verwendeten eukaryotischen Modellorganismus. Sie besitzt gegenüber anderen eukaryotischen Modellorganismen große Vorteile, wie beispielsweise ihre einfache Handhabung und ihre relativ unproblematische genetische Manipulation. Häufig eingesetzt wird *S. cerevisiae* zur homologen oder heterologen Expression von Membranproteinen und deren elektrophysiologische Charakterisierung über Patch-Clamp-Experimente.

1.5.1 Heterologe Expression von Tok1p und Tok1p-Mutanten in *Xenopus*-Oozyten

Mutationen in der Signatursequenz

Versuche von Lesage (1996) zeigen, dass ein Austausch von Leucin und Tyrosin in den beiden Tok1p-Signatursequenzen zu nichtfunktionalen Kanälen führt, auch wenn dabei nur ihre Lage im Gesamtprotein verändert wird.

Dies deutet darauf hin, dass die beiden Signatursequenzmotive GLG und GYG für die Klasse der Zwei-Porendomänen-Kanäle unerlässlich sind und eventuell als Homologiekriterium für 2P-Kanäle eingesetzt werden können (Lesage et al., 1996).

Mutationen in Prä- bzw. Postporeloop-Regionen

Mutationen in den extracytoplasmatischen Präporeloop-Regionen wurden von Vergani und Blatt (1999) durchgeführt. Nach Synthese der cRNA und deren Injektion in Frosch-Oozyten, untersuchten sie die auftretende Kanalaktivität der mutierten Tok1p-Kanalproteine. Sie kamen zu dem Schluss, dass Mutationen der Aminosäure N410 zu D in der N-terminalen Region vor Pore 2 die Aktivierungskinetik des Kanals bei niedrigen Kaliumkonzentrationen stark verlangsamt, während die Mutation der entsprechenden Aminosäure N 275 zu D im Präporeloop der 1. Pore wenig Einfluss auf die kaliumabhängige Aktivierung hat. Dagegen wirkt sich die Mutation N275D auf die kaliumabhängige Deaktivierung des Kanals aus. Da eine Doppelmutation von N275D/N410D die Charakteristik beider Einzelmutationen zeigte, gehen Vergani und

bei der Stabilisierung der leitenden Pore untersucht werden. Desweiteren soll die Auswirkung von Aminosäureaustauschen im GYG/GLG Motiv untersucht werden. Schließlich soll versucht werden die Eigenschaften des Tok1p-Kanals, sowie die Auswirkungen der Mutationen durch ein kinetisches Modell zu simulieren.

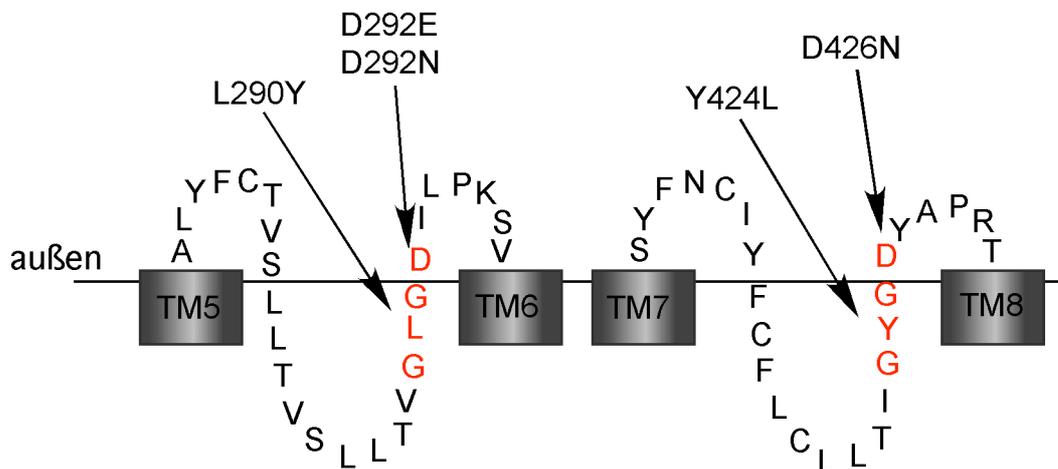


Abbildung 1.8 Aminosäure-Austauschmutationen im Selektivitätsfilter. Dargestellt sind die Transmembrandomänen TM5-TM8 mit den beiden dazwischen angeordneten Porenloops. Neben den aufgeführten Einzelmutationen wurden noch die Doppelmutationen (D292/426N) und (L290Y/Y424L) generiert und durch Wachstumsversuche und elektrophysiologische Messungen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Organismen und Plasmide

2.1.1 *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

<i>S. cerevisiae</i>	Genotyp	Herkunft
PLY232	<i>MATa his3Δ200 leu2-3, 112 trp1Δ901 ura3-52 suc2Δ9</i>	P. Ljungdal Stockholm
PLY238	<i>MATa his3Δ200 leu2-3, 112 trp1Δ901 ura3-52 suc2Δ9 tok1Δ1::HIS3</i>	P. Ljungdal Stockholm
PLY240	<i>MATa his3Δ200 leu2-3, 112 trp1Δ901 ura3-52 suc2Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX</i>	P. Ljungdal Stockholm
PLY246	<i>MATa his3Δ200 leu2-3, 112 trp1Δ901 ura3-52 suc2Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX tok1Δ1::HIS3</i>	P. Ljungdal Stockholm
CEN.PK20a	<i>MATa ura3-52 trp1-289 leu2-3, 112 his3Δ1 Mal2-8c SUC-2 tok1Δ::URA3</i>	T. Miosga Darmstadt

Tabelle 2.1 Genotypen der verwendeten Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1.2 *E. coli* Stämme

<i>E. coli</i>	Genotyp	Herkunft
DH5 α	<i>deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(rkΔmkΔ), recA1, relA1, supE44, thi1, Δ(lacZYA-argFV169), Δ80ΔlacZΔM15, F, Δ</i>	Clontech Lab.
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB lacIΔZΔM15Tn10(TetΔ)]</i>	Stratagene

Tabelle 2.2 Genotypen der verwendeten Stämme von *E. coli*

2.1.3 Verwendete Plasmide

Plasmide	Beschreibung	Herkunft
YEp352-SUF/TOK1	episomaler Expressionsvektor in Hefe, abgeleitet von YEp352 (Hill et al., 1986), Expression des <i>TOK1</i> -ORF steht unter Kontrolle des konstitutiven <i>SUF14</i> -Promotors	T. Miosga Darmstadt
YEp352-SUF	episomaler Expressionsvektor in Hefe, abgeleitet von YEp352 (Hill et al., 1986), ohne <i>TOK1</i> -ORF als Insert	diese Arbeit

Tabelle 2.3 Beschreibung der verwendeten episomalen Hefe-Expressionsvektoren

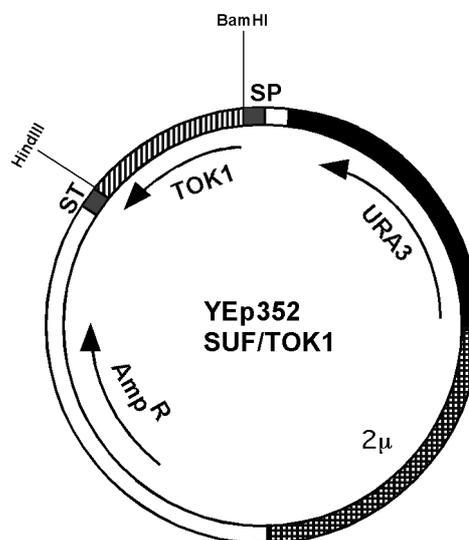


Abbildung 2.1 Vektorkarte des episomalen Expressions-Vektors Yep352-SUF/TOK1

2.1.4 Synthetische Oligonucleotide

Primer	Sequenz 5' → 3'	Annealing-Temperatur	Firma
AB1	CGGGATCCCGATGACAAGGTTTCATGAACAG	59°C	Roth
AH1743D	CCCAAGCTTGGGTCAATTACAGGTCC	56°C	Roth
AH1407E	CCCAAGCTTGGGTCAAATATCCAGAGAAG	56°C	Roth
AB186ΔN	CGGGATCCCGATGAATGCAGAGCCTTC	59°C	Roth
AH2076	CCCAAGCTTGGGTCAAAGTGTCTTTCTATGCT	58°C	Roth
AM-L290Y	ACCGTGGGATACGGTGACATCCTGCC	70°C	MWG
AM-L290Yrk	GGCAGGATGTCACCGTATGGGACGGT	70°C	MWG
AM-Y424L	ACCATTGGATTGGGAGACTATGCTCCAAGG	68°C	MWG
AM-Y424Lrk	CCTTGGAGCATAGTCTCCCAATCCAATGGT	68°C	MWG
AM-D292E	ACCGTGGGACTAGGTGAAATCCTGCC	68°C	MWG
AM-D292Erk	GGCAGGATTTACCTAGTCCCACGGT	68°C	MWG
AH2019Stop	CCCAAGCTTGGGTCACTCTTCGTCTTCTACTAGAT TACC	62,6°C	MWG

Tabelle 2.4 Primer zur Mutagenese

Primer	Sequenz 5' → 3'	Annealing-Temperatur	Firma
SUF-178Sq	CGAGCCTTTCTCCCATGG	58°	Roth
SUF+119Sq	CGCACTGCTTCAACGTGC	58°	Roth
Sq1324I	ATGGCACGGCTCCCAACG	60°	Roth
Sq304G	CAACTACACAGGCTATCGAG	60°	Roth
Sq524D/E	CAGGATGGACAATAGCTGGAGG	68°	Roth

Tabelle 2.5 Primer zur Sequenzierung

2.2 Medien

Alle Medien wurden in H₂O_{bidest} angesetzt und bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert.

2.2.1 Medien zur Anzucht von *E. coli*

Medium	Zusammensetzung
Luria-Bertani-Medium (LB)	10g/l Trypton; 5g/l Hefeextrakt; 5g/l NaCl mit NaOH auf pH 6,5 einstellen
LB-Amp	LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin
LB-Agarplatten	LB-Medium mit 2% Agar
LB-Amp-Agarplatten	LB-Amp-Medium und 2% Agar
NZY-Medium	10g/l Casein enzym.verdaut, 5g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl, 2g MgSO ₄ , pH 7,0

Tabelle 2.6 Medien zur Anzucht von *E. coli*.

2.2.2 Medien zur Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Medium	Zusammensetzung
YPD-Medium	1% Hefeextrakt, 2% Bactopecton, 2% Glucose
SD(-ura)-Medium (Clontech)	26,7g SD-Base, 0,77g Supplement (-Ura)
SD(-ura)-Agarplatten (Clontech)	46,7g SD-Base + Agar, 0,77g Supplement (-Ura)
SDAP-Agarplatten pH6,5 (<u>S</u> ynthetisches <u>D</u> extrose L- <u>A</u> rginin - <u>P</u> hosphat-Medium)	20g/l Glucose, 1,742g/l L-Arginin, 0,49g/l MgSO ₄ *7H ₂ O, 0,735g/l CaCl ₂ *2H ₂ O pH 6,5 (mit H ₃ PO ₄), 20g/l Agar (Sigma purified A7921) 10ml 100XSpurenelement-, 10ml 100XVitamin- und 10ml 100XAminosäure-Lösung (Vitamine erst nach Abkühlen auf < 50°C zugeben). <u>Spurenelement-Lösung (100X)</u> 477,0mg FeNaEDTA, 49,0mg H ₃ BO ₃ , 6,25mg CuSO ₄ , 9,96mg KI, 45,6mg MnSO ₄ , 24,2mg Na ₂ MoO ₄ , 71,9mg ZnSO ₄ , 12,0mg CoCl ₂ , 12mg NiCl ₂ <u>Vitamin-Lösung (100X)</u> 0,2mg/l Biotin, 40mg/l Ca-Panhotenat, 0,2mg/l Folsäure, 20mg/l Inositol, 40mg/l Niacin, 20mg/l p- Aminobenzoessäure, 40mg/l Pyridoxinhydrochlorid, 20mg/l Riboflavin, 40mg/l Thiaminhydrochlorid <u>Aminosäure-Lösung (100X)</u> 5g/l Tryptophan, 5g/l Histidin, 5g/l Leucin
SDAP-Agarplatten pH3,5	Zusammensetzung wie oben (für 1Liter Medium). Einstellen auf pH3,5 nach Autoklavieren durch Zugabe von 600µl 80% H ₃ PO ₄

Tabelle 2.7 Medien zur Anzucht von *S. cerevisiae*

2.2.3 Medien zur Protoplastierung und Patch-Clamp-Messungen von Hefezellen

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
Inkubationspuffer (Puffer A)	50mM KH ₂ PO ₄ mit KOH auf pH 7,2 eingestellt, 0,2% β- Mercaptoethanol
Protoplastierungspuffer (Puffer B)	Puffer A mit 2,4M Sorbitol, 0,01-0,03mg/ml Zymolyase (20T) 25mg/ml BSA (Sigma)
Stabilisierungspuffer (Puffer C)	220mM KCl, 10mM CaCl ₂ , 5mM MgCl ₂ , 5mM MES mit Tris-base auf pH 7,2 titriert, Zusatz von Glucose auf eine Endkonzentration von 1%
Pipettenlösung für Whole-Cell-Messungen (Puffer G)	195mM KCl, 1mM EGTA, 0,15mM CaCl ₂ , 4mM MgCl ₂ , 4mM ATP mit KOH auf pH7,0 titriert. Aliquots von 3ml sollten bis zum Gebrauch bei -20°C tiefgefroren werden
Badlösung (Perfusionslösung)	150mM KCl, 10mM CaCl ₂ , 5mM MgCl ₂ , 1mM MES mit Tris base auf pH 6,5 titriert

Tabelle 2.8 Medien für Patch-Clamp-Messungen

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae*

Um eine größere Menge an Plasmid-DNA aus Hefen isolieren zu können, müssen diese zuerst protoplastiert werden. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgt über Bindung an eine Silicasäule.

Hierzu wurden 15ml der Übernachtskultur des Hefestammes für 8 Minuten bei 3000rpm abzentrifugiert, das Pellet in 1ml 0,9M Sorbitol/0,1M EDTA resuspendiert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation der Zellsuspension für 30 Sekunden bei 3000rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5415C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 0,4ml 0,9M Sorbitol/ 0,1M EDTA resuspendiert und mit 0,1ml einer Zymolyase-Stammlösung (2mg/ml) versetzt. Es folgte eine Inkubation für 40 Minuten bei 30°C, um der Zymolyase die Spaltung der Hefezellwände zu ermöglichen. Nach 40 Minuten wurde der Ansatz für fünf Minuten bei 3000rpm abzentrifugiert und der Überstand abgezogen.

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte nun nach der Anleitung des Midiprep Kits von Peqlab. Nachdem das Pellet in 0,5ml Resuspensionspuffer vollständig resuspendiert wurde erfolgte die Zugabe von 0,5ml Lysepuffer. Nach 2 Minuten wurde der Neutralisierungspuffer zupipettiert und durch mehrmaliges Kippen sorgfältig gemischt. Um eine vollständige Präzipitation von Proteinen und chromosomaler DNA zu gewährleisten, erfolgte eine einstündige Inkubation des Ansatzes auf Eis. Zur Entfernung der präzipitierten Proteine wurde der Ansatz bei 14000rpm für 15 Minuten in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5415 C) abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde anschließend in eine Peqlab-Midiprep-Säule überführt. Die Plasmid-DNA wurde nach dem Peqlab Midiprep Kit Protokol aufgereinigt.

2.3.2 Transformation von *E. coli* mit Hilfe der CaCl_2 -Methode/Hitzeschock

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* erfolgte nach der CaCl_2 -Methode von Evans und Bignell (1996).

Zur Transformation wurden 0,5µg DNA und 150µl der kompetenten *E. coli*-Zellsuspension verwendet. Für die Transformation von Ligationsprodukten wurden 2-10µl des Ligationsansatzes auf 50µl kompetenter *E. coli* eingesetzt.

Der Ansatz wurde für 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 60 Sekunden in einen Thermoblock mit 42°C überführt. Nach einer 3 minütigen

Inkubation auf Eis wurde dem Ansatz 0,8ml LB-Medium zugesetzt. Bei der Transformation von Ligationsprodukten wurde anstelle von LB-Medium SOC-Medium verwendet. Um den transformierten *E. coli*-Zellen die Ausbildung der Ampicillin-Resistenz zu ermöglichen, wurden sie bei 37°C und 200rpm für 45 Minuten inkubiert. Nach Abzentrifugieren und Resuspendieren in 150µl LB- bzw. SOC-Medium wurde der gesamte Ansatz auf LB-Amp100-Platten ausplattiert und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.3.3 Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli*

10ml LB-Amp-Medium wurden mit jeweils einer Einzelkolonie der transformierten *E. coli* beimpft und bei 200rpm und 37°C für 12 Stunden inkubiert.

Die Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli* erfolgte mit dem Peqlab Miniprep Kit.

2.3.4 Klonierungsstrategie der C- bzw. N-terminalen Tok1p-Deletionsmutanten

Die Klonierung erfolgte durch Addition zusätzlicher Restriktionsschnittstellen an die Enden der amplifizierten PCR-Produkte.

Die C-terminalen Tok1p-Deletionsmutanten wurden über eine PCR mit *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega) und pSUF/*TOK1* als Template amplifiziert. Dabei wurde das 5'-Ende des Sense-Primers AB1 modifiziert, um eine zusätzliche BamHI-Schnittstelle anzufügen. An den Antisense-Primer AH, der das komplementäre Stopcodon der jeweiligen Deletionsmutanten enthielt, war eine zusätzliche HindIII-Schnittstelle angebracht. Die Schnittstellen für BamHI und HindIII sind in den jeweiligen Primersequenzen unterstrichen und die Start- beziehungsweise Stop-Codons fett hervorgehoben.

Primer AB1: CGGGGATCCCGATGACAAGGTTTCATGAACAG

Primer AH1743D: CCCAAGCTTGGGTCAATTACAGGTCC

Primer AH1407E: CCCAAGCTTGGGTCAATATCCAGAGAAG

Primer AH2019Stop: CCCAAGCTTGGGTCACTCTTCGTCTTCTACTAGATTACC

Zur Konstruktion der C-terminalen Deletionsmutante Δ C(L582Stop) wurde das Stopcodon TGA (Primer AH1743D) an den Nucleinsäure-Positionen 1744-1746 eingefügt. Bei der Mutante Δ C(K470Stop) wurde durch Anhängen des Stopcodons

TGA an den Positionen 1408-1410 (Primer AH1407E) der C-Terminus verkürzt. Der dritten C-terminalen Deletionsmutante, $\Delta C(L674Stop)$, wurde das Stopcodon TGA nach Position 2019 angefügt.

Die Konstruktion der N-terminalen-Deletionsmutante $\Delta N(I62Start)$ erfolgte unter Verwendung von pSUF-*TOK1* als Template und den beiden Primern AB186 ΔN und AH2076 ebenso über eine Einschritt-PCR, wie für die C-terminalen Deletionsmutanten beschrieben. Dabei wurde im Primer AB186 ΔN das Codon der Aminosäure Isoleucin 62 (ATT) zum Startcodon ATG modifiziert.

Primer AB186 ΔN : CGGGATCCCGATGAATGCAGAGAAG

Primer AH2076: CCCAAAGCITTGGGTCAAAGTGTCTTTCTATGCT

2.3.5 Mutagenese der Tok1p-Deletionsmutanten

Die Amplifizierung der C- bzw. N-terminalen Deletionsmutanten wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt. Jeder PCR-Ansatz enthielt 20mM Tris-HCl pH8,8, 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 100µg/ml BSA, 0,1% Triton X-100, 0,8mM dNTP-Mix, jeweils 60pmol der verwendeten Primer, 2units *Pfu* DNA-Polymerase (Promega) und wurde mit H₂O_{bid.} auf 100µl aufgefüllt. Die eingesetzte Template-Menge an pSUF-*TOK1* variierte zwischen 100 und 200ng Plasmid-DNA.

Die PCR wurde im PC-960 Microplate Thermal Sequenzer von Corbett Research unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Promega) durchgeführt.

Das PCR-Temperaturprogramm ist in Tabelle 2.9 dargestellt.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	3 min.	1
Denaturierung	94°C	30 sec.	30
Primer-Annealing	bei der primer-spezifischen Annealing-Temperatur (siehe Tabelle 2.4)	30 sec.	
Elongation	72°C	120-220 sec. abhängig von der Länge des Amplifikationsproduktes	
Finale Elongation	72°C	7 min.	1

Tabelle 2.9 PCR-Temperaturprogramm

Nach Ablauf der finalen Elongation wurden die PCR-Ansätze sofort auf Eis gestellt. Um die Spezifität der Amplifikation zu erhöhen, erfolgte die Zugabe der *Pfu* DNA-Polymerase erst nach dem initialen Denaturierungsschritt (hot-start).

2.3.6 Präparative Agarosegele zur Isolierung und Aufreinigung der PCR-Fragmente

Die Fragmentgröße der amplifizierten PCR Produkte wurde durch ein 1%-tiges Agarosegel überprüft. Amplifikationsprodukte, die nur spezifische Banden im Gel zeigten, wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN aufgereinigt, bevor sie der Doppelrestriktionsspaltung unterzogen wurden. Bei Auftreten unspezifischer Amplifikationsprodukte erfolgte die Isolierung und Aufreinigung des gewünschten PCR-Fragments über ein präparatives TAE-Agarosegel und den QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit von QIAGEN.

2.3.7 Restriktionsspaltung der PCR-Fragmente

Um die amplifizierten PCR-Fragmente in das Vektorfragment pSUF ligieren zu können, musste zuvor eine Doppelrestriktionsspaltung mit BamHI/HindIII durchgeführt werden. Diese erfolgte im von Sigma, sowohl für BamHI als auch für

HindIII, empfohlenen Puffersystem SB bei 37°C. Dabei wurden pro Enzym und Restriktionsansatz 3u Enzym/µg pDNA eingesetzt. Nach einer Inkubation von 15 Stunden erfolgte eine Aufreinigung der Restriktionsansätze nach dem QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN. Die Elution erfolgte in 15µl bidestilliertem Wasser. Die so gereinigten und gespaltenen PCR-Produkte wurden als Insert bei der Ligation eingesetzt.

2.3.8 Restriktionsspaltung und Aufreinigung des Vektorfragments pSUF

Zur Vektorpräparation wurde das pYEp-SUF/*TOK1*-Plasmid mit BamHI/HindIII geschnitten. Dazu wurden pro Enzym und Restriktionsansatz 3u Enzym/µg pDNA eingesetzt. Anschließend wurden die beiden Fragmente des pSUF/*TOK1*-Plasmids über ein 1%-tiges TAE-Agarosegel aufgetrennt, das Vektorfragment pSUF aus dem Gel isoliert und nach dem QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol (QIAGEN) aufgereinigt. Die Elution des Vektorfragmentes erfolgte in 30µl bidestilliertem Wasser. Ebenso erfolgte eine Isolierung und Aufreinigung des *TOK1*-ORF aus dem Gel. Dieses wurde als Insert für die Positiv-Ligationskontrolle eingesetzt.

2.3.9 Ligation

Die Ligation erfolgte mit der T4 DNA Polymerase von NEB für 4,5 Stunden bei Raumtemperatur (ca. 25°C) nach folgendem Ansatz.

Ligationsansatz

12,0 µl Insert

5,0 µl Vektor pSUF

2,0 µl Ligasepuffer

1,0 µl T4 DNA Ligase

Als negative Kontrollreaktion wurde der obige Ligationsansatz mit 12µl H₂O_{bid.} anstelle des Inserts angesetzt. Zur Überprüfung der Ligationseffizienz wurde eine Religation des bei der Vektorpräparation mit BamHI und HindIII herausgeschnittenen *TOK1*-ORF durchgeführt.

Die genaue Konzentration der DNA-Fragmente war nach der Aufreinigung aus dem Gel photometrisch nicht bestimmbar, so dass hier nur Volumenangaben und keine Konzentrationsangaben gemacht werden können.

2.3.10 Herstellung der Tok1p-Aminosäure-Austauschmutanten über Site-Directed-Mutagenese

Die Herstellung der Tok1p-Aminosäure-Austauschmutanten erfolgte mit dem QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene. Für die site-directed-Mutagenese-PCR wurden modifizierte, HPSF-gereinigte Oligonucleotid-Primer der Firma MWG eingesetzt (siehe Tabelle 2.4). Die Durchführung erfolgte nach dem Stratagene-Protokoll unter Berücksichtigung der individuellen Parameter. Das bei der Site-Directed Mutagenese eingesetzte Temperaturprotokoll ist in Tabelle 2.10 dargestellt.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	30 sec.	1
Denaturierung	95°C	30 sec.	18
Primer-Annealing	55°C	1 min.	
Elongation	68°C	16 min.	

Tabelle 2.10 PCR-Temperaturprotokoll

Nach dem letzten Elongationsschritt wurden die PCR-Ansätze sofort für 2 Minuten auf Eis gestellt. Der anschließende *DpnI*-Restriktionsverdau und die Transformation der XL1-Blue wurden nach Angaben des Kit-Herstellers durchgeführt.

2.3.11 Überprüfung der Mutationen durch Sequenzierung

Zur Überprüfung der korrekten Mutationen wurden die Plasmide von der Firma GATC sequenziert.

2.3.12 Herstellung und Transformation kompetenter Hefen

Zur Herstellung einer Vorkultur wurden 5ml YPD-Medium/50mM KCl in einem 50ml Erlenmeyerkolben mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 30°C und 200rpm für 16 Stunden inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 50ml YPD-Medium/50mM KCl in einem 100ml Erlenmeyerkolben auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,2 angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30°C und 200rpm für 4-5 Stunden, bis eine OD₆₀₀ zwischen 0,8 und 1,0 erreicht war. Die Transformation des Hefestammes PLY246 erfolgte mit dem episomalen *S. cerevisiae*-Expressionsvektor pYEp-SUF/*TOK1*, beziehungsweise dem pYEp-SUF mit den mutierten *TOK1*-Genen, nach dem CLONTECH-Yeastmaker Yeast Transformation System User Manual (PT1172-1).

Für die Transformationen wurden jeweils 1µg Plasmid-DNA und 300µg Heringtestes-DNA verwendet. Die Transformationsansätze wurden auf SD(-ura)-Selektionsmedium ausplattiert und bei 30°C für drei Tage inkubiert.

2.4 Zellbiologische Methoden

Da die Kaliumaufnahme bei *S. cerevisiae* hauptsächlich über die beiden Kalium-Aufnahmesysteme Trk1p und Trk2p und über den nicht selektiven Kationen-Kanal Nsc1p abläuft, wurden die Wachstumsexperimente alle mit der *trk-tok*-„loss-of-function“-Mutante PLY246 durchgeführt (Bertl et al., 1993, 1998, a; Bihler et al., 1998, Bertl et al., 2004).

Dieser Hefestamm PLY246 besitzt den Genotyp *MATa his3Δ200 leu2-3, 112 trp1Δ901 ura3-52 suc2Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX tok1Δ1::HIS3* und ist deshalb für die Wachstumsexperimente als *trk1Δtrk2Δtok1Δ*-Null-Hintergrund prädestiniert. In Medien mit millimolaren Kaliumkonzentrationen ist die Kaliumaufnahme dieser Mutante zu gering, um ein Wachstum zu ermöglichen. Die Überexpression des Kaliumkanals Tok1p ermöglicht es diesem Hefestamm jedoch, auf Kaliummangelmedium zu wachsen.

Um zu überprüfen, ob diese Komplementationsfähigkeit auch bei den mutierten Tok1p-Kanalproteinen auftritt, wurden Wachstumsversuche auf Kalium-Minimalmedium durchgeführt. Wachstum auf 10mM Kalium-Platten konnte als erster Hinweis auf Funktionalität der Kanalmutanten gedeutet werden.

Dabei wurden die Wachstumsbedingungen so gewählt, dass eine Kaliumaufnahme über das nichtselektive Kaliumaufnahmesystem Nsc1p ausgeschlossen wird. Dies ist in Medien mit hoher Calciumkonzentration (5mM) gewährleistet, denn Nsc1p wird durch millimolare Konzentrationen divalenter Kationen im Außenmedium blockiert und erst bei Calciumkonzentrationen um 10µM und darunter aktiviert. Bei den gewählten Wachstumsbedingungen mit 5mM Calcium im Medium erfolgte somit eine Blockierung des Nsc1p-Kanals, so dass der unter diesen Bedingungen auftretende Wachstumseffekt ausschließlich auf die Aktivität des überexprimierten Tok1p-Kanals zurückzuführen ist.

Weitere Versuchsansätze auf Natrium-, Rubidium- und Cäsium-Selektivmedien sollten zeigen, ob die Mutationen im Kanalprotein Auswirkungen auf die Selektivität der mutierten Kanäle haben.

2.4.1 Durchführung der Wachstumsversuche

Die Hefestämme für die Wachstumsversuche wurden auf SD(-ura)-50mM-Kalium-Platten ausgestrichen und für drei Tage bei 30°C inkubiert. Mit je einer Einzelkolonie wurden 10ml SD(-ura)-50mM-Kalium-Flüssigmedium inokuliert und bei 30°C über Nacht inkubiert. Von diesen Übernachtkulturen, die sich mit einer OD₆₀₀ zwischen 3-5 in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurde 1ml abzentrifugiert, mit sterilem bidestilliertem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Resuspension des Zellpellets erfolgte in 1ml sterilem H₂O_{bidest.}

Um für die Wachstumsexperimente eine Verdünnungsreihe mit identischer Zellzahl zu erlangen, wurde die 1. Verdünnungsstufe auf eine OD₆₀₀ von 1,0 (+/- 0,05) mit sterilem H₂O_{bidest} eingestellt. Bei haploiden Hefezellen wären das ca. 3x10⁶ Zellen/ml. Aus dieser Ausgangsverdünnung wurde eine Verdünnungsreihe 1/10, 1/100 und 1/1000 hergestellt.

Auf die entsprechenden SDAP-Platten (**S**ynthetisches-**D**extrose-**L**-**A**rginin-**P**hosphat), wurden mit einer Eppendorfpipette jeweils 7µl jeder Verdünnungsstufe aufgetropft.

Das verwendete SDAP-Medium enthielt Glucose als Kohlenstoffquelle und L-Arginin als Stickstoffquelle. Die genaue Zusammensetzung dieses synthetischen Selektivmediums ist unter 2.2.2 angegeben. Die Auswertung der Platten erfolgte nach einer Inkubation von vier Tagen bei 30°C. Anschließend wurden die Platten zur Dokumentation eingescannt und mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe-Photoshop bearbeitet.

Bei allen im folgenden ausgeführten Wachstumsversuchen erfolgte die Durchführung nach der in 2.4.1 beschriebenen Anleitung.

Zur Überprüfung des Wachstumsphänotyps von PLY246 ohne Plasmid wurde den verwendeten Medien zusätzlich 50mg/l Uracil zugesetzt, da es sich bei den Stämmen um uraciluxotrophe Hefen handelt.

2.4.2 Test der Tok1p-Mutanten auf Funktionalität

Der Wachstumstest der Mutanten erfolgte auf SDAP-Platten mit 1000mM, 100mM und 10mM Kaliumchlorid. Das Wachstum auf 10mM Kalium-Agarplatten stellte das Beurteilungskriterium für die Komplementationsfähigkeit der mutierten Kanalproteine dar. Die Wachstumsversuche auf SDAP-Agarplatten mit 1000mM Kalium sollten zeigen, ob eine Wachstumshemmung bei hohen Kaliumkonzentrationen auftritt.

2.4.3 Wachstumsversuche zur Selektivität

Um eventuelle Auswirkungen der Aminosäuremutationen auf die Kanalselektivität des Tok1p-Proteins nachzuweisen, wurde das in 2.2.2 aufgeführte SDAP-Medium mit Natriumchlorid (490mM), Rubidiumchlorid (490mM) und Cäsiumchlorid (10mM) versetzt.

2.5 Elektrophysiologie / Patch-Clamp-Methode

Die von Sakman und Neher (1981) entwickelte Patch-Clamp-Methode ist ein spezielles Voltage-Clamp-Verfahren, bei dem durch Aufsetzen einer Glaspipette Ionenkanäle in einer Membran elektrisch isoliert und untersucht werden können. Eine wichtige Voraussetzung für Patch-Clamp-Messungen ist eine saubere Membranoberfläche, da nur so die notwendige hohe Abdichtung (Gigaseal) zwischen Glasoberfläche und Membran zustande kommen kann. Bei Untersuchungsobjekten mit Zellwand, wie Hefe- oder Pflanzenzellen, muss diese zuerst enzymatisch entfernt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die im molekularbiologischen Teil generierten Tok1p-Mutanten protoplastiert und mit der Patch-Clamp-Technik elektrophysiologisch charakterisiert.

2.5.1 Protoplastierung von *S. cerevisiae*

Die Anzucht der Hefen für die elektrophysiologischen Experimente erfolgte in 50ml Erlenmeyerkolben mit 10ml SD(-ura)-50mM Kalium-Flüssigmedium bei 30°C für 18 Stunden.

Die Protoplastierung der für die Patch-Clamp-Messungen benötigten Hefezellen erfolgte nach dem Protokoll von Bertl et al. (1998, b).

10ml einer Hefekultur (späte Log-Phase) wurden bei 2000rpm für 5 Minuten in einer Beckmann-Zentrifuge abzentrifugiert, in 3ml Puffer A resuspendiert und für 30 Minuten bei 30°C und 200rpm inkubiert (Puffer siehe Tabelle 2.8). Nach Zupipettieren von 4ml Puffer B wurde der Zellsuspension Zymolyase 20T bis zu einer Endkonzentration von 0,03mg/ml (Z20T) zugesetzt. Zymolyase ist ein Enzymgemisch aus *Arthrobacter luteus*, das neben α 1,3-Glucanasen auch verschiedene Proteasen enthält. Da diese Proteasen jedoch die zu untersuchenden Kanalproteine schädigen können, ist es notwendig, dem Protoplastierungsansatz Rinderserumalbumin (BSA) in einer Konzentration von 25mg/ml zuzusetzen.

Um ein effektives Aufbrechen der Hefezellwand zu erreichen, erfolgte eine Inkubation dieses Ansatzes bei 30°C und 200rpm für 45 Minuten. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Hefezellen in 10ml Puffer C resuspendiert. Dieser Zellsuspension wurde Glucose bis zu einer Endkonzentration von 1% zugesetzt. Dies führt zu einem Anschwellen der Sphäroplasten und damit zur Entfernung der anhaftenden Zellwandreste.

2.5.2 Durchführung der Elektrophysiologie und Datenanalyse

Zur Messung wurden die Protoplasten in eine mit Badlösung (150mM KCl, 10mM CaCl₂ und 5mM MgCl₂, pH6,5) gefüllte Messkammer pipettiert und nach einer Sedimentationsphase gleichmäßig mit Perfusionslösung umspült.

Um eine Verschmutzung der Messpipette beim Eintauchen in die Badlösung zu vermeiden, wurde ein schwacher Überdruck angelegt. Nach Eintauchen der Messelektrode in die Badlösung mussten die Elektrodenpotenziale abgeglichen und die Spannungsoffsets auf Null gesetzt werden.

Die Annäherung der Glasmikroelektrode an die Zelle erfolgte mit Hilfe eines Mikromanipulators unter Beobachtung im Mikroskop. Kurz vor Erreichen der Zelle wurde der Überdruck von der Pipette genommen und durch Anlegen eines schwachen Unterdrucks der Protoplast an die Pipettenspitze gesaugt. Durch schwaches, gleichmäßiges Saugen konnte eine hohe Abdichtung (Seal) zwischen der Membran und der Glasoberfläche erreicht werden.

Während dieser Sealbildung wurde ein 5ms langer rechteckförmiger Testpuls mit 5mV an der Messpipette angelegt. Die entsprechende Stromantwort wurde in einen Widerstandswert umgerechnet und konnte am Oszilloskopmodul des Computers als Pipettenwiderstand fortlaufend abgelesen werden. Bei Werten über 1G Ω war die

Cell-attached-Konfiguration erreicht (Abb.2.2). Um Zugang zum Zellinneren zu erhalten, wurde ein kurzer (200µs), hoher Spannungspuls von ca. 1V an die Membran angelegt. Meist war schon durch Anlegen dieses Spannungspulses ein Durchbruch des Membranflecks (Patch) in der Pipettenöffnung möglich, ansonsten wurde zusätzlich ein leichter Unterdruck angelegt.

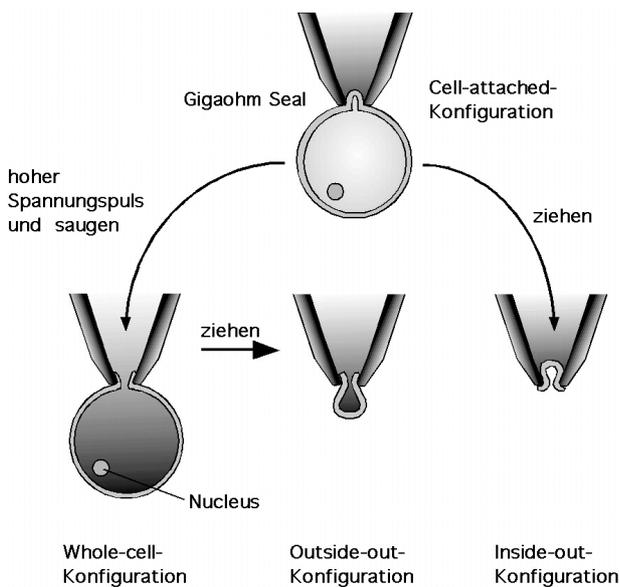


Abbildung 2.2

Messkonfigurationen bei Patch-Clamp-Experimenten.

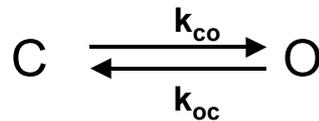
Nach erfolgreichem Durchbrechen der Membran und Stabilisierung des Seals wurde die Membran ausgehend von einer Haltespannung (-40mV) auf verschiedene Spannungen geklemmt. Die Spannungsprotokolle sind in den jeweiligen Abbildungen angegeben.

Alle elektrophysiologischen Experimente wurden, wie in Roller et al. (2005) beschrieben, mit einem EPC9-Verstärker und dem Programm Pulse+Pulse-Fit-8,5 von HEKA Elektronik durchgeführt und ausgewertet.

2.6 Simulation der elektrophysiologischen Ganzzelleitungen

Das PulseSim-Programm von HEKA ist ein Programm zur Simulation und zur Analyse von elektrophysiologischen Daten. Mit diesem Programm ist es möglich, die Eigenschaften eines einzelnen Ionenkanals oder auch einer ganzen Population von Ionenkanälen basierend auf kinetischen Modellen oder diskreten Markov-Modellen zu simulieren. Diese Markov-Modelle sind wertvolle Werkzeuge zur Untersuchung der Kinetik spannungsregulierter Ionenkanäle.

Als einfachstes kinetisches Modell zur Beschreibung eines spannungsabhängigen Ionenkanals kann ein Zweizustandsmodell betrachtet werden. In diesem Modell kann der Kanal nur in zwei diskreten Zuständen vorliegen: offen (o) oder geschlossen (c).



Die Übergänge zwischen diesen beiden Zuständen werden durch die Geschwindigkeitskonstanten k_{co} und k_{oc} beschrieben. Im Falle eines spannungsabhängigen Ionenkanals sind diese beiden Geschwindigkeitskonstanten spannungsabhängig in der Form:

$$k_{co} = k_{co}^0 e^{zeV / skT} \quad \text{und} \quad k_{oc} = k_{oc}^0 e^{-zeV / (1-s)kT} \quad (\text{Gl.1a,b})$$

Dabei sind k_{co}^0 und k_{oc}^0 die fundamentalen Geschwindigkeitskonstanten bei einer elektrischen Spannung von $V=0$, k ist die Boltzmannkonstante, e ist die Elementarladung, z ist die Ladungszahl, T ist die absolute Temperatur und s ist ein Maß für die Lage der Energiebarriere. Die beiden Zustände c und o geben im Falle von Einzelkanälen die Aufenthaltswahrscheinlichkeit (P_o und P_c) an, bei Betrachtung einer ganzen Population von Ionenkanälen ist dies die Anzahl der Kanäle im jeweiligen Zustand (N_o und N_c).

Der Strom durch einen einzelnen Kanal ist proportional zur Leitfähigkeit g_o des Kanals, zur Offenwahrscheinlichkeit P_o und zur angelegten Spannung V . Es gilt

$$i_o = g_o V P_o \quad (\text{Gl.2})$$

Entsprechend ist der Strom durch eine Population von Ionenkanälen gegeben durch

$$I = n i_o = g_o V N_o \quad (\text{Gl.3})$$

wobei n die Anzahl der beobachteten Kanäle ist.

Wird die angelegte elektrische Spannung verändert, so ändert sich P_o bzw. N_o und somit der elektrische Strom I (gemittelter Einzelkanalstrom oder Strom durch eine ganze Population von Kanälen) mit der Zeit.

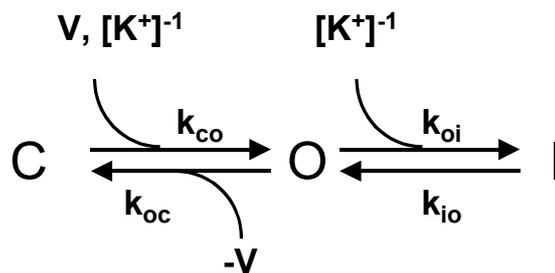
Mathematisch lässt sich das zeitliche Verhalten mit einer Exponentialfunktion beschreiben.

$$I(t) = I (1 - ae^{-t/\tau}) \tag{Gl.4}$$

mit $\frac{1}{\tau} = k_{co} + k_{oc}$ und $a = (I - I_0)/I$ (Gl.5a,b)

Dabei ist $I(t)$ der Strom zum Zeitpunkt t , I_0 und I der Strom zum Zeitpunkt $t=0$ bzw. $t=\infty$. Durch Anpassung von Gleichung 4 an die experimentell bestimmten Daten kann die Zeitkonstante τ für die Relaxation, nicht aber die einzelnen Geschwindigkeitskonstanten für den Öffnungsvorgang und für den Schließvorgang ermittelt werden, da die Relaxationszeit τ von der Summe der beiden Geschwindigkeitskonstanten abhängt.

Tritt eine Inaktivierung in den Stromspuren auf, wie in den unten beschriebenen Daten, muss das kinetische Modell um einen inaktiven Kanalzustand erweitert werden (3-Zustandsmodell). Der Kanal kann dann in drei diskreten Zuständen vorliegen: offen, geschlossen oder inaktiv.



Der zeitliche Verlauf der Relaxation wird nun durch die Summe zweier Exponentialfunktionen mit zwei Relaxationszeiten τ_1 und τ_2 beschrieben. Es gilt

$$I(t) = I + I_1(1 - e^{-t/\tau_1}) + I_2(1 - e^{-t/\tau_2}) \tag{Gl.6}$$

$$\text{mit } \frac{1}{\tau_1} = \frac{a}{2} + \sqrt{\frac{a^2}{4} + b} \quad \text{und} \quad \frac{1}{\tau_2} = \frac{a}{2} - \sqrt{\frac{a^2}{4} + b} \quad (\text{Gl.7a,b})$$

wobei die 4 Zeitkonstanten in den Hilfsausdrücken a und b enthalten sind. Dabei gilt

$$a = k_{co} + k_{oc} + k_{oi} + k_{io} \quad \text{und} \quad b = k_{co}k_{oi} + k_{io}k_{oc} + k_{co}k_{io} \quad (\text{Gl.8a,b})$$

Die beiden Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 können durch Anpassung von Gleichung 6 an die experimentellen Daten ermittelt werden. Um neben dem zeitlichen Verlauf der Stromkurven auch eine Aussage über die zugrundeliegenden Mechanismen der Aktivierung, Deaktivierung und Inaktivierung von Tok1p treffen zu können, wurde das zeitliche Verhalten eines Ionenkanals nach obigem Modell simuliert und die simulierten Daten mit den experimentell ermittelten Daten verglichen. Eine zufriedenstellende Übereinstimmung der grundlegenden Eigenschaften von Tok1p mit denen des Modells konnte durch Einführung einer Spannungsabhängigkeit für die Geschwindigkeitskonstanten k_{co} und k_{oc} , sowie einer Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k_{co} und k_{oi} von der externen Kaliumkonzentration, erreicht werden.

Spannungsabhängigkeit und Kaliumabhängigkeit sind gegeben durch

$$k_{co} = [K^+]^{\alpha_1} k_{co}^0 e^{zeV / sKT} \quad (\text{Gl.9a})$$

$$k_{oc} = k_{oc}^0 e^{-zeV / (1-\alpha_2)KT} \quad (\text{Gl.9b})$$

$$k_{oi} = [K^+]^{\alpha_1} k_{oi}^0 \quad (\text{Gl.9c})$$

Dabei ist $[K^+]$ die extrazelluläre Kaliumkonzentration, z , e , k , s und T haben die übliche Bedeutung (siehe oben). Die Geschwindigkeitskonstanten k_{co}^0 , k_{oc}^0 , k_{oi}^0 sind die fundamentalen Geschwindigkeitskonstanten bei 0mV und 1M K^+ . Die für die Simulation eingesetzten Parameter sind in Tabelle 2.11 aufgelistet.

Parameter/Variable	Tok1p 50mM K ⁺	D292N 50mM K ⁺
Anzahl der Kanäle	950	<u>750</u>
$\alpha =$ Übergangsrate kco	0.01s ⁻¹	0.01s ⁻¹
$\beta =$ Übergangsrate koc	10s ⁻¹	10s ⁻¹
$\gamma =$ Übergangsrate koi	0.04s ⁻¹	0.04s ⁻¹
$\delta =$ Übergangsrate kio	0.4s ⁻¹	0.4s ⁻¹
q = Anzahl zu verschiebender Ladungen	2.3	2.3
s = Position der Energiebarriere	0.5	0.5
sigma = Zustand der Leitfähigkeit	45pS	45pS
K = Kaliumkonzentration (lokal)	0.05M	<u>0.005M</u>
dep1 = Kaliumempfindlichkeit co	1	1
dep2 = Kaliumempfindlichkeit oi	2	<u>1</u>
Haltespannung	-80mV	-80mV
Umkehrspannung	-40mV	-40mV

Tabelle 2.11 Zur Simulation mit dem 3-Zustandsmodell eingesetzte Variablen und Parameter

3. Ergebnisse

3.1 Phänotyp von Tok1p (Wildtypkanal)

Hefestämme mit funktionalen Kaliumaufnahme-systemen Trk1p und Trk2p (PLY232:*TRK1-TRK2-TOK1*, PLY238:*TRK1-TRK2-tok1Δ*) zeigen sowohl in 10mM, als auch in 100mM Kalium robustes Wachstum, das zwischen pH3,5 und pH6,5 auch unabhängig vom pH-Wert des Mediums ist (Abb.3.1). Im Gegensatz dazu zeigen Stämme mit nichtfunktionalen Trk1p/Trk2p-Systemen (PLY240:*trk1Δ-trk2Δ-TOK1*) in stark saurem Milieu (pH3,5) erhebliche Wachstumsdefizite und dies sowohl bei hohen (100mM), als auch bei niedrigen (10mM) Kaliumkonzentrationen im Medium. Auf Medium mit 100mM Kalium und pH6,5 ist diesen Trk1p/Trk2p-Doppeldeletionsmutanten ein Wachstum möglich.

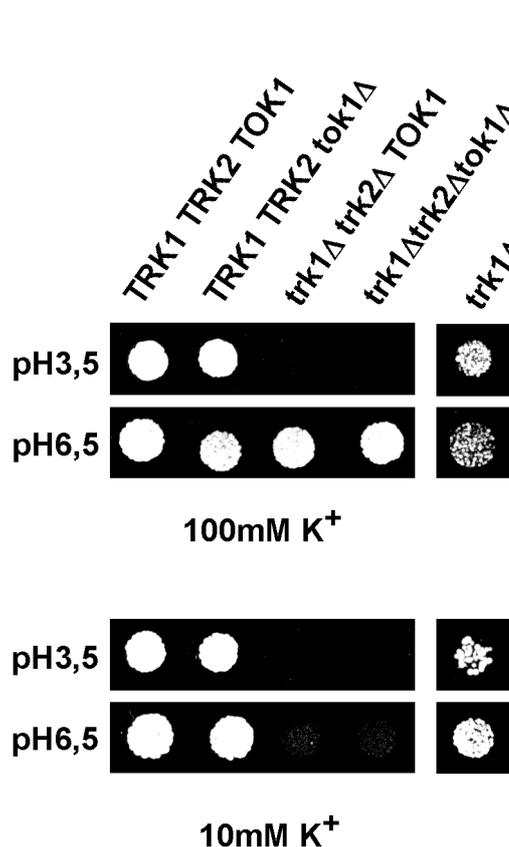


Abbildung 3.1 Kalium- und pH-abhängiges Wachstum des Hefestammes *TRK1-TRK2-TOK1* (PLY232), der *tok1p*-Deletionsmutante *TRK1-TRK2-tok1Δ* (PLY238), der *trk1p/trk2p*-Deletionsmutante *trk1Δtrk2ΔTOK1* (PLY240) und der Trippeldeletionsmutante *trk1Δtrk2Δtok1Δ* (PLY246) auf SDAP+UA-Medium bei pH3,5 bzw. pH6,5 und den angegebenen Kaliumkonzentrationen (links).

Wachstumsphänotyp von PLY246 bei episomaler Überexpression des *TOK1* auf SDAP-Medium bei pH3,5 bzw. pH6,5 und den angegebenen Kaliumkonzentrationen (rechts).

Eine zusätzliche Deletion des Kaliumauswärtsgleichrichters Tok1p (PLY246) hat keinen erkennbaren Einfluss auf das Wachstum, weder bei niedrigen Kaliumkonzentrationen, noch bei hohen pH-Werten im Medium.

Episomale Überexpression von Tok1p hebt jedoch den Trk-abhängigen Wachstumsdefekt der Trippeldeletionsmutante PLY246 teilweise wieder auf. Dem

Hefestamm PLY246 (*trk1Δtrk2Δtok1Δ*) ist es unter Überexpression des Tok1p-Kanals möglich auf 10mM Kalium zu wachsen und zwar unabhängig vom pH des Mediums. Dies ist wohl auf die Fähigkeit von Tok1p zurückzuführen, zumindest unter bestimmten Voraussetzungen die Kaliumaufnahme in Hefezellen zu vermitteln (Fairman, et al., 1999).

3.2 Test der Tok1p-Mutanten auf Funktionalität

Die mutierten Tok1p-Kanalproteine wurden im Trippeldeletionsstamm PLY246 überexprimiert und in Wachstumsexperimenten auf SDAP-Platten mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen auf Funktion getestet. Die Wachstumsexperimente erfolgten im direkten Vergleich zum Hefestamm PLY246 mit überexprimiertem Wildtypkanal und mit einem leeren Vektor (pYE_p-SUF oder pFI61). Das Kriterium für Funktionalität der Tok1-Kanalmutanten war Wachstum des transformierten PLY246 auf 10mM Kalium.

3.2.1 C- bzw. N-terminale-Deletionsmutanten

Wachstumsexperimente mit den C-terminalen Deletionsmutanten Tok1p(L582Stop), Tok1p(K470Stop) und Tok1p(L674Stop) auf SDAP-Platten mit 10mM Kalium zeigten, dass alle drei mutierten Kanalproteine funktionsfähig waren (Abbildung 3.2).

Um festzustellen, ob dem N-Terminus des Tok1p-Kanals eine Funktion in der Regulation oder in der Kanalassemblierung zukommt, wurde die N-terminale Deletionsmutante Tok1p(I62Start) konstruiert und ihre Funktion anhand von Wachstumsversuchen überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Mutante Tok1p(I62Start) durchaus in der Lage ist, das Kaliumaufnahmedefizit des PLY246 auf 10mM Kalium zu komplementieren und das obwohl ihr der gesamte N-Terminus fehlt.

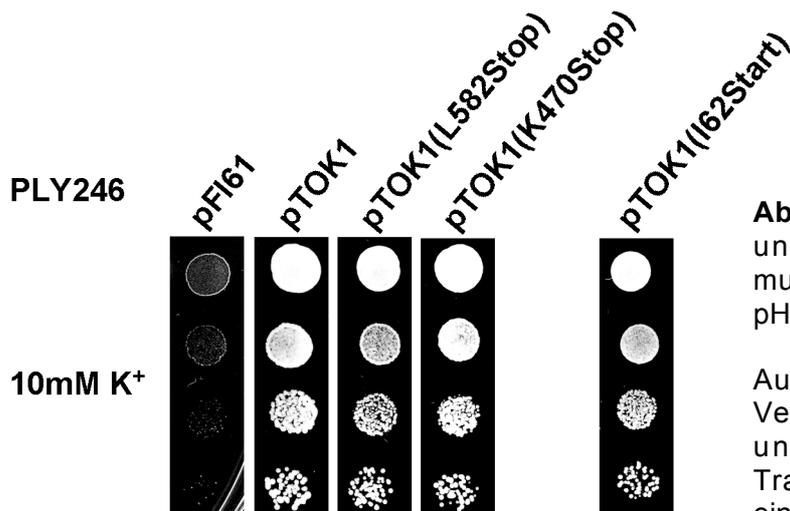


Abbildung 3.2 Wachstum der C- und N-terminalen Deletionsmutanten auf SDAP-Medium bei pH6,5 und 10mM Kalium.

Aufgetragen sind die seriellen Verdünnungsstufen 1, 1/10, 1/100 und 1/1000 der PLY246-Transformanten ausgehend von einer $OD_{600}=1,0 (\pm 0,05)$.

3.2.2 Tok1p-Aminosäure-Austauschmutanten

L \leftrightarrow Y und Y \leftrightarrow L-Mutanten

Um die Frage zu beantworten, ob die Anordnung der beiden Signaturmotive GLGD und GYGD die Funktion des Kanals beeinflusst, wurden über gerichtete Mutagenese drei Porenloop-Mutanten generiert. In der Mutante Tok1p(L290Y/Y424L) wurde die Anordnung der beiden Signaturmotive invertiert, so dass im ersten Porenloop das Motiv GYGD und im zweiten Porenloop das GLGD-Motiv lokalisiert ist. Bei Mutante Tok1p(L290Y) wurde das Leucin im ersten Porenloop gegen ein Tyrosin ausgetauscht, so dass im mutierten Kanalprotein vier GYGD-Motive vorhanden sind. In der Mutante Tok1p(Y424L) wurden die Tyrosine im zweiten Porenloop gegen Leucin ausgetauscht. Der funktionale Tok1p(Y424L)-Kanal enthielt damit vier GLGD-Motive.

In Wachstumsexperimenten zeigte sich, dass alle drei Mutanten Tok1p(L290Y/Y424L), Tok1p(L290Y) und Tok1p(Y424L) in der Lage sind die fehlende Kaliumaufnahme des PLY246 bei 10mM Kalium zu komplementieren (Abb.3.3).

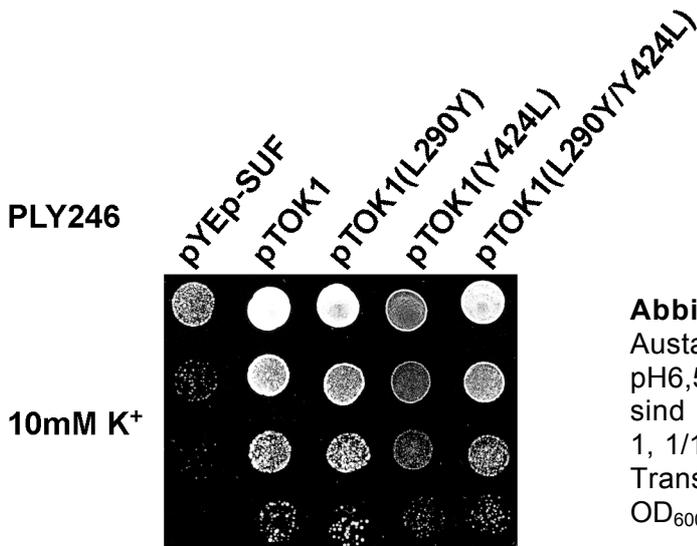


Abbildung.3.3 Wachstum der L/Y-Austauschmutanten auf SDAP-Platten pH6,5 und 10mM Kalium. Aufgetragen sind die seriellen Verdünnungsstufen 1, 1/10, 1/100 und 1/1000 der PLY246-Transformanten ausgehend von einer OD₆₀₀=1,0 (±0,05).

D□ N-Mutanten

Da in fast allen Kaliumkanälen die Asparaginsäure (D) in der Kaliumkanal-Signatursequenz hoch konserviert ist, sollte durch die beiden Mutanten D292N und D426N die Funktion dieser Asparaginsäure im Kanalprotein Tok1p geklärt werden.

Bei den beiden D□ N-Mutanten wurden die Asparaginsäuren (D) an Position 292 im ersten Porenloop und die Asparaginsäure an Position 426 im zweiten Porenloop durch die Aminosäure Asparagin (N) ersetzt. Durch diesen Aminosäureaustausch D zu N wurden im funktionalen Tok1p-Kanalprotein jeweils zwei negativ geladene Aspartatseitenketten entfernt. Auch die D□ N-Mutanten konnten auf 10mM Kalium-Agarplatten wachsen, so dass von ihrer vollen Funktionsfähigkeit ausgegangen werden kann. Der Mutante D292N war es sogar bei 7,5mM Kalium noch möglich zu wachsen (Abbildung 3.4).

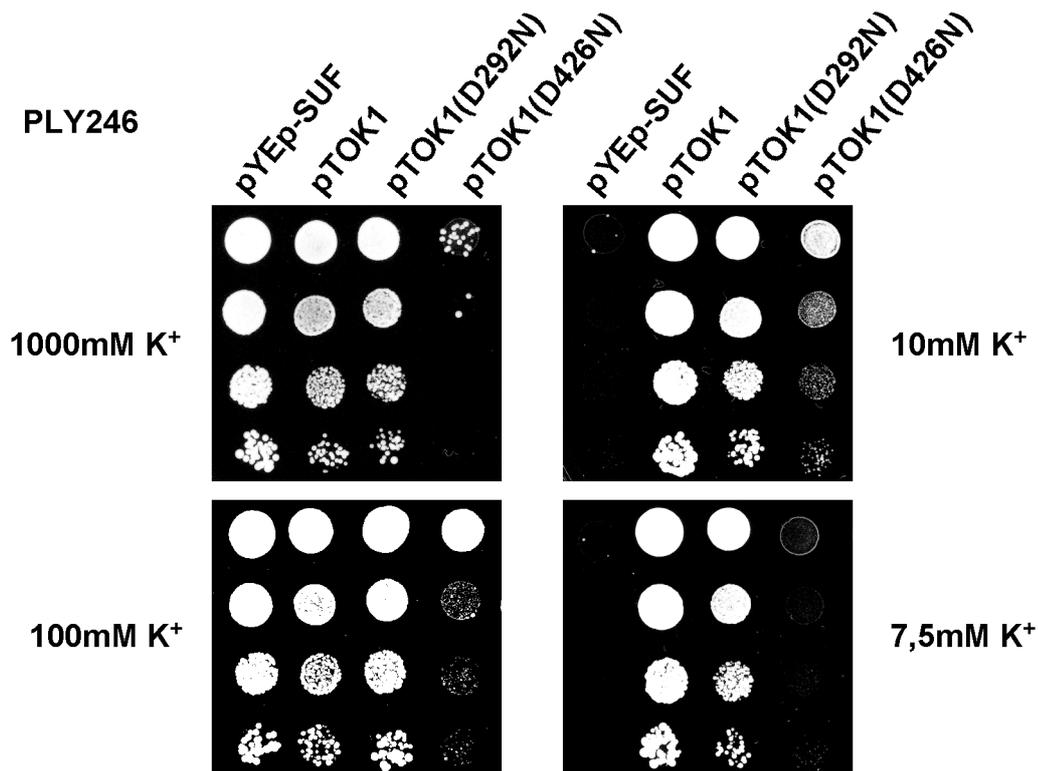


Abbildung 3.4 Wachstum der D \square N-Mutanten auf SDAP-Platten, pH6,5 bei den angegebenen Kaliumkonzentrationen. Aufgetragen sind die seriellen Verdünnungsstufen 1, 1/10, 1/100 und 1/1000 (von oben nach unten) der PLY246-Transformanden ausgehend von einer OD₆₀₀=1,0 (\pm 0,05).

Wie in Abbildung 3.4 zu erkennen ist, kann der Stamm PLY246 mit dem mutierten Kanal Tok1p(D426N) bei einer Kaliumkonzentration von 1000mM nicht wachsen. Auch bei 100mM Kalium im Medium ist das Wachstum dieser Mutante schon deutlich reduziert. Dies verwundert, da es sich bei der Mutante D426N um die äquivalente Mutation wie bei Mutante D292N handelt, wobei sich der Aminosäureaustausch D zu N im zweiten Porenloop befindet. Aufgrund dieses Wachstumsphänotyps kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Porenloops nicht äquivalent zur Porenbildung und Kanalfunktion beitragen.

Bei der Doppelmutante D292/426N wurde die Asparaginsäure an Position 292 und gleichzeitig auch die Asparaginsäure an Position 426 gegen Asparagin ausgetauscht. Wie in Abbildung 3.5 zu erkennen ist, zeigt die Doppelmutante keine Fähigkeit zur Komplementation auf 10mM Kalium-Agarplatten. Auf 100mM beziehungsweise 1000mM Kalium wächst sie jedoch gut. Dieser Wachstumsphänotyp entspricht der Kontrolle mit leerem Vektor (PLY246pYEp-SUF). Wenn man den Wachstumsphänotyp dieser D \square N-Doppelmutante bei 100mM Kalium und einem pH-Wert von 3,5 betrachtet, zeigt die D \square N-Mutante im Gegensatz zum

PLY246-pSUF deutliches Wachstum. Dies spricht dafür, dass auch der mutierte Tok1p(D292/426N)-Kanal funktional ist, jedoch ohne Komplementation des Kaliumaufnahmedefizites zu zeigen.

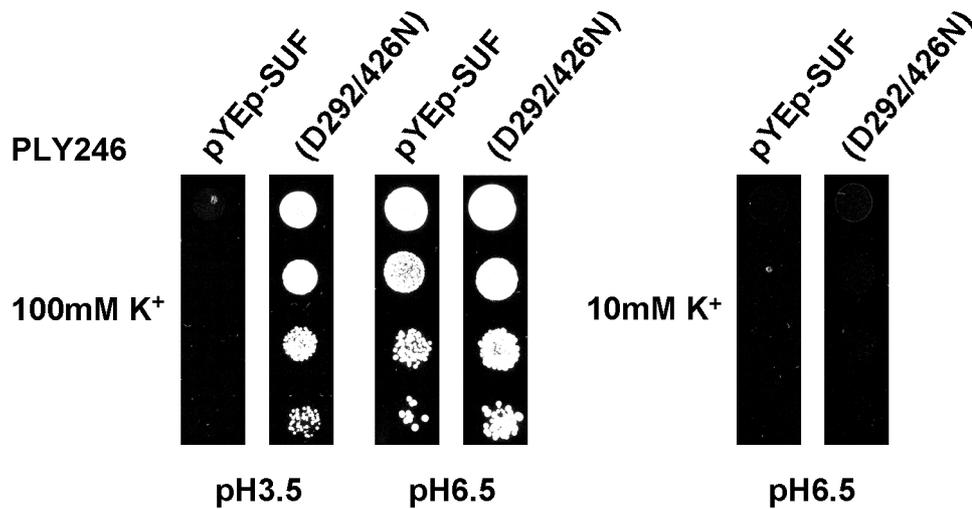


Abbildung 3.5 Wachstum der D292/426N-Mutante auf SDAP-Platten mit 100mM Kalium bei pH3,5 und pH6,5 und mit 10mM Kalium bei pH6,5. Aufgetragen sind die seriellen Verdünnungsstufen 1, 1/10, 1/100 und 1/1000 (von oben nach unten) der PLY246-Transformanten ausgehend von einer $OD_{600}=1,0 (\pm 0,05)$.

PLY246-Transformanten	1000mM K ⁺	100mM K ⁺	10mM K ⁺
Leerer Vektor	++	++	-
pTOK1	++	++	++
pTOK1(L582Stop)	++	++	++
pTOK1(K470Stop)	++	++	++
pTOK1(L674Stop)	++	++	++
pTOK1(I186Start)	++	++	++
pTOK1(L290Y)	+	++	++
pTOK1(Y424L)	+	++	+
pTOK1(L290Y/Y424L)	++	++	++
pTOK1(D292N)	++	++	++
pTOK1(D292E)	++	++	++
pTOK1(D426N)	-	+	+
pTOK1(D292/426N)	++	++	-

Tabelle 3.1 Wachstum der Tok1p-Mutanten im Vergleich zum PLY246 mit dem leeren Vektor und dem PLY246 unter Expression des Wildtypkanals Tok1p (PLY246-pTOK1) auf SDAP-Platten mit pH 6,5 und bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen. Die Symbole stehen für: ++ Wachstum entsprechend PLY246-pTOK1, + schwaches Wachstum, - kein Wachstum.

Die Wachstumsversuche aus Abbildung 3.2–3.5 sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Da alle Mutanten im Wachstumsexperiment Komplementation auf 10mM Kalium zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass alle hier getesteten Kanalmutanten funktional sind. Zur weiteren Charakterisierung der Mutanten wurden Wachstumsversuche zur Selektivität und elektrophysiologische Messungen durchgeführt.

3.3 Auswirkungen der Mutationen auf die Selektivität des Kanalproteins Tok1p

Wildtypkanal Tok1p

Das Tok1p-abhängige Wachstum auf 10mM Kalium scheint durch monovalente Kationen wie Cäsium und Natrium im Medium nur geringfügig beeinflusst zu werden. Das Wachstum auf 10mM Kalium und 10mM Kalium/490mM Natrium bzw. 10mM Kalium/10mM Cäsium ist fast identisch. Bei Zusatz von 490mM Rubidium (Rb^+) im Medium tritt jedoch eine starke Wachstumshemmung auf (Abb.3.6).

D₁ N-Mutanten

Der direkte Vergleich der beiden Mutanten D292N und D426N auf 10mM K^+ /490mM Na^+ im Medium zeigt eine deutliche Wachstumshemmung der D292N-Mutante, während bei der Mutante D426N kein negativer Effekt auf das Wachstum festzustellen ist.

Unter Zusatz von Rubidium im Medium ist das Wachstum der D426N-Mutante vollständig gehemmt. Im Wachstum von D292N ist jedoch keinerlei Hemmung zu erkennen (Abb.3.6). Diese Abweichungen im Wachstumsphänotyp bei Zusatz monovalenter Kationen sind ein weiterer Hinweis, dass die beiden Porenloops nicht äquivalent zur Porenbildung beitragen.

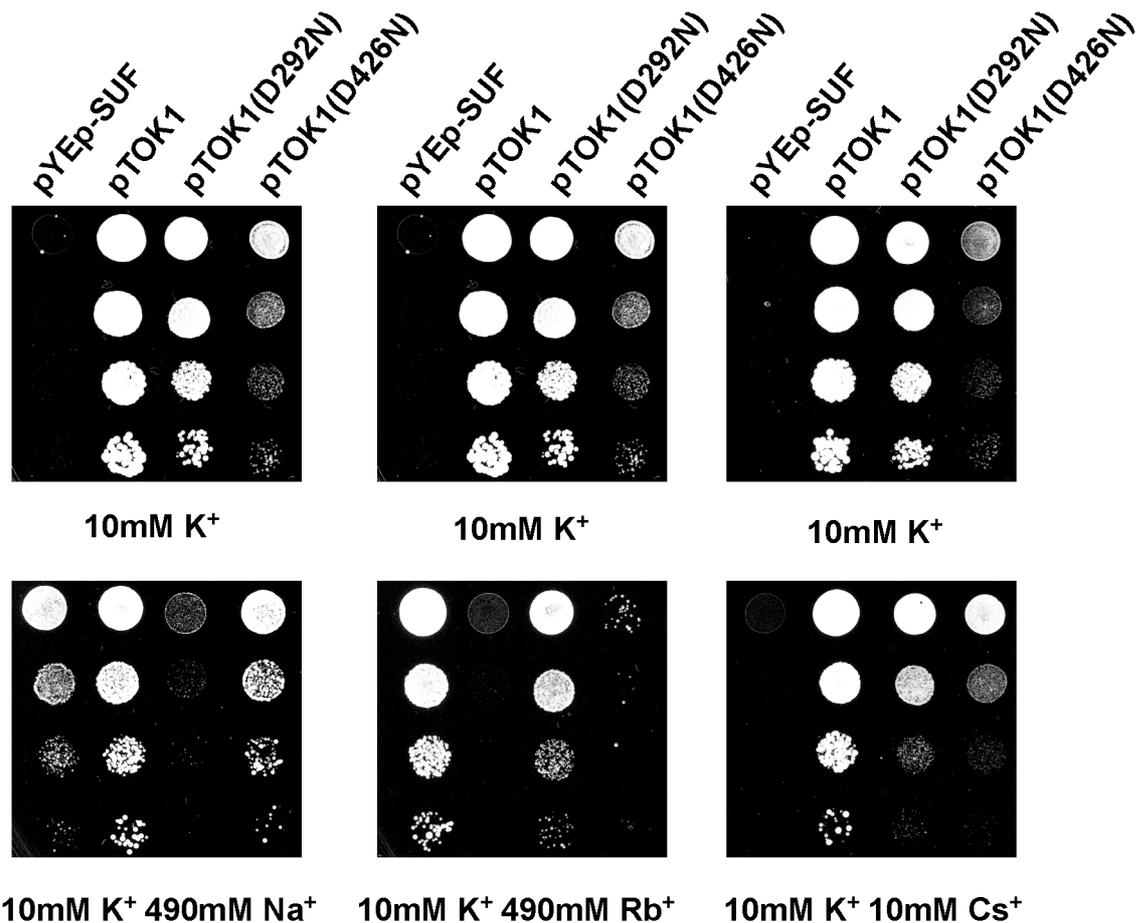


Abbildung 3.6 Wachstum der D \square N-Mutanten auf SDAP-Platten pH6,5 und 10mM Kalium unter Zusatz der monovalenten Kationen Natrium, Rubidium und Cäsium. Aufgetragen sind die seriellen Verdünnungsstufen 1, 1/10, 1/100 und 1/1000 der PLY246-Transformanden ausgehend von einer OD₆₀₀=1,0 (\pm 0,05).

In Tabelle 3.2 ist die Selektivität der Tok1p-Aminosäure-Austauschmutanten noch einmal zusammenfassend dargestellt.

PLY246-Transformanden	490mM Na ⁺	490mM Rb ⁺	50mM Li ⁺	10mM Cs ⁺
Leerer Vektor	+	++	-	-
pTOK1	++	-	++	++
pTOK1(D292N)	-	++	+	+
pTOK1(D426N)	++	-	+	+
pTOK1(D292/426N)	+	++	-	-

Tabelle 3.2 Wachstum der Tok1p-Mutanten im Vergleich zum PLY246 mit dem leeren Vektor und dem PLY246 unter Expression des Wildtypkanals Tok1p (PLY246-pTOK1) auf SDAP-Medium mit pH 6,5 und bei 10mM Kalium und Zusatz monovalenter Kationen. Die Symbole stehen für: ++ Wachstum entsprechend PLY246-pTOK1, + schwaches Wachstum, - kein Wachstum.

3.4 Elektrophysiologische Charakterisierung von Tok1p

Für die elektrophysiologischen Experimente wurde Tok1p von einem Multicopy-Plasmid in dem Hefestamm PLY246 (*trk1Δtrk2Δtok1Δ*) exprimiert. Die messbaren Tok1p-Ströme waren im Vergleich zu Wildtyp-Hefen um den Faktor 20 erhöht. Aus den gemessenen Ganzzellströmen, der Einzelkanalleitfähigkeit von Tok1p und der Offenwahrscheinlichkeit kann für Wildtypzellen eine Kanaldichte von 1-5 Kanälen pro μm^2 angenommen werden. Diese Kanaldichte wird durch die Überexpression des Kanalproteins von dem hier verwendeten Multicopy-Plasmid (pYEp-SUF) auf über 25 Kanäle pro μm^2 erhöht werden. Dadurch lässt sich das Signal/Rausch Verhältnis deutlich verbessern. Dies erwies sich insbesondere bei einigen Kanalmutanten als großer Vorteil.

3.4.1 Abhängigkeit der Tok1p-Aktivierung von der Membranspannung und der externen Kaliumkonzentration.

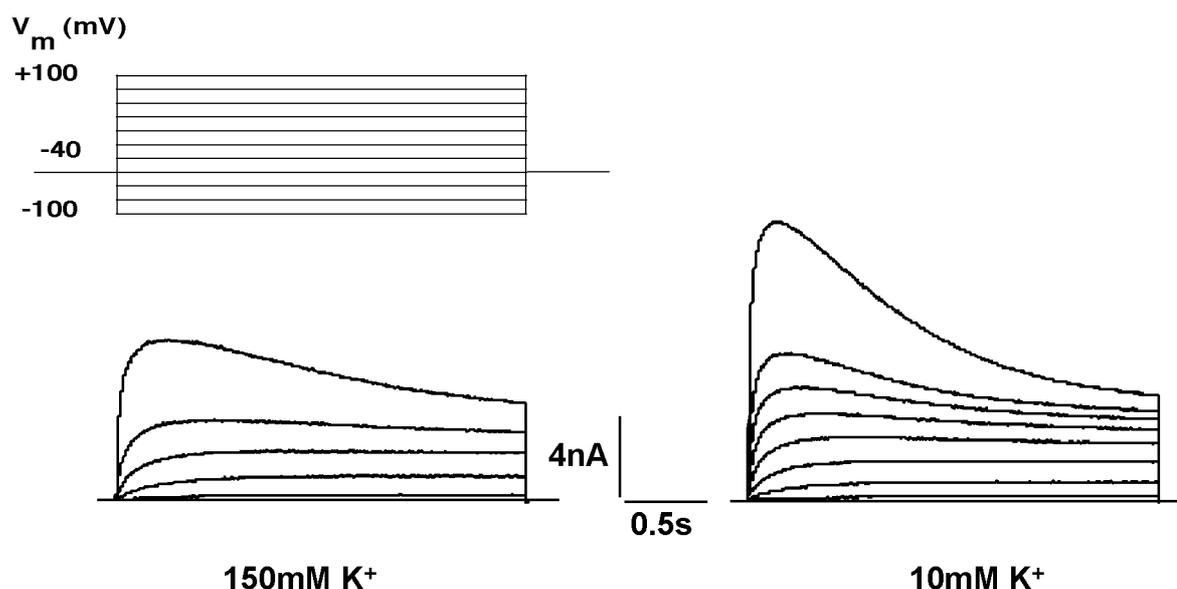


Abbildung 3.7 Ganzzelleableitung PLY246-pTok1p. Spannungsprotokoll (links oben): ausgehend von einer Haltespannung von -40mV wurde die Membran auf Spannungen von $+100\text{mV}$ bis -100mV (in 20mV -Stufen) geklemmt. Nach $2,5\text{s}$ wurde die Membran erneut auf die Haltespannung von -40mV geklemmt. Zwischen den Pulsen lagen Zeitintervalle von $0,5\text{s}$. Links sind die Stromspuren von PLY246-pTok1p bei 150mM Kalium dargestellt, rechts bei 10mM Kalium.

In Abbildung 3.7 sind typische Stromspuren von Ganzzelleableitungen bei 150mM Kalium und 10mM Kalium zusammen mit dem verwendeten Standard-

Spannungsprotokoll (oben links) abgebildet. Bei 150mM KCl in der Badlösung zeigen die Tok1p-Stromspuren eine langsame Aktivierung und bei Spannungen bis +60mV keine Inaktivierung. Erst bei Spannungen von +80mV und +100mV tritt eine schwache Inaktivierung auf.

Bei Erniedrigung der externen Kaliumkonzentration auf 10mM ist eine schnellere Aktivierung in den Stromspuren erkennbar. Ebenso wird in Abbildung 3.7 deutlich, dass die Peak-Ströme des Wildtypkanals mit abnehmender extrazellulärer Kaliumkonzentration ansteigen. Bei 150mM extrazellulärem Kalium beträgt der Peak-Strom 8,1nA und bei 10mM Kalium steigt der Peak-Strom bis auf 15,4nA an. Bei Kaliumkonzentrationen unter 5mM ist jedoch kein Anstieg in den Peak-Strömen mehr zu beobachten, sondern ein rapider Abfall (hier nicht gezeigt).

Auch die Gleichgewichtsströme (Steady-State) sind bei 10mM Kalium im Außenmedium größer als bei 150mM Kalium.

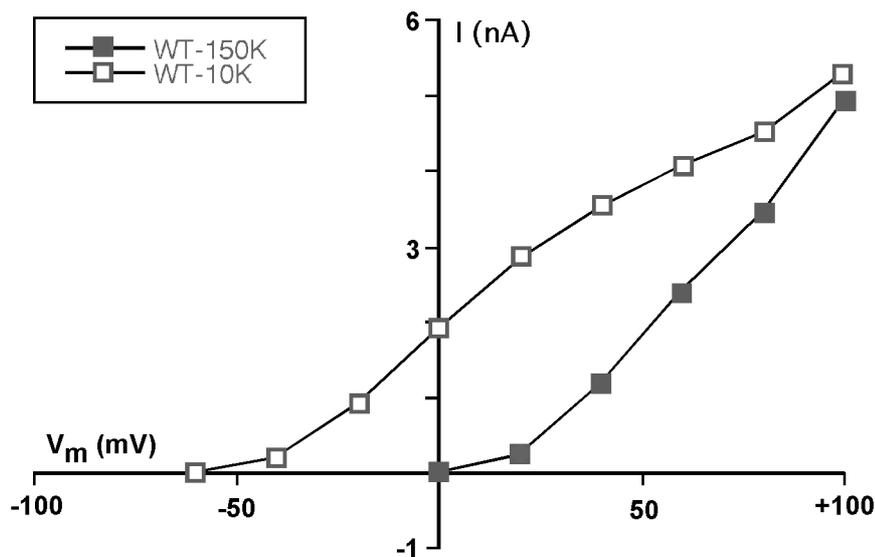


Abbildung 3.8 Strom-Spannungs-Kennlinie aus den in Abbildung 3.7 erhaltenen Gleichgewichts-Membranströmen des Wildtypkanals PLY246-pTok1p bei 150mM Kalium und 10mM Kalium.

In Abbildung 3.8 sind die Gleichgewichtsströme aus Abbildung 3.7 in Abhängigkeit von der angelegten Membranspannung graphisch dargestellt. Es ist erkennbar, dass sich die Strom-Spannungs-Kennlinie mit abnehmender Kaliumkonzentration zu negativeren Membranspannungen verschiebt. Die theoretische Umkehrspannung von Tok1p liegt bei einer internen Kaliumkonzentration von 195mM und einer externen Kaliumkonzentration von 150mM Kalium bzw. 10mM Kalium, bei -7mV beziehungsweise -76mV.

Der zeitliche Verlauf der Stromantworten wurde in erster Näherung durch die Summe zweier Exponentialfunktionen beschrieben. Die daraus bestimmte Zeitkonstante für die Aktivierung ist in Abbildung 3.9 in Abhängigkeit von der Membranspannung und der externen Kaliumkonzentration dargestellt.

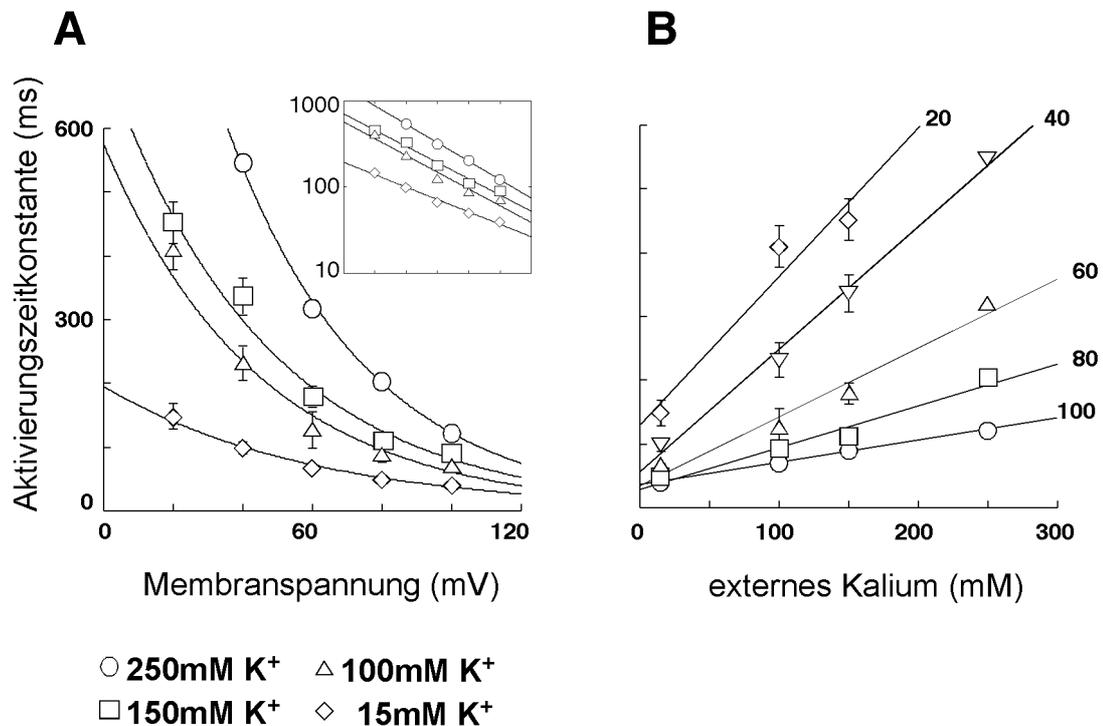


Abbildung 3.9 Aktivierungszeitkonstante des Tok1p-Kanals in Abhängigkeit von der Membranspannung (A) und der externen Kaliumkonzentration (B). Die Zahlen rechts an den Kurven in (B) geben die jeweiligen Membranspannungen an. Anzahl der durchgeführten Experimente $n = 13$.

Die Abhängigkeit der Aktivierungszeitkonstante von der Membranspannung lässt sich durch eine Exponentialfunktion beschreiben. Dabei ist die Steigung der Funktion relativ unabhängig von der externen Kaliumkonzentration. Dies ist am besten in der halblogarithmischen Auftragung (Abb.3.9A Inset) zu sehen. Die Steigungen der Exponentialfunktionen sind im Einzelnen $-0,024$ (250mM KCl), $-0,022$ (150mM KCl), $-0,022$ (100mM KCl) und $-0,018$ (15mM KCl). Betrachtet man die Zeitkonstante für die Aktivierung bei einer gegebenen Membranspannung in Abhängigkeit der externen Kaliumkonzentration, so ist hier eine lineare Abhängigkeit festzustellen, wobei Kaliumabhängigkeit (Steilheit der Geraden in Abb. 3.9B) mit steigender Membranspannung abnimmt.

Zusammenfassend führt die Absenkung der extrazellulären Kaliumkonzentration im Bereich von 250mM bis 10mM zu:

- einer verstärkt auftretenden Inaktivierung in den aufgezeichneten Stromkurven bis zu einem Membranpotenzial von +40mV
- einer sehr viel schnelleren Aktivierung
- einer deutlichen Erhöhung der Peak-Ströme wie auch der Steady-State-Ströme bei allen angelegten Spannungen
- Verschiebung der Steady-State Strom-Spannungs-Kennlinie in negativer Richtung (Abb.3.8).

3.4.2 Abhängigkeit der Tok1p-Stromamplitude von der Haltespannung

In Abbildung 3.10 ist die Abhängigkeit der Stromspuren von der angelegten Haltespannung für den Wildtypkanal Tok1p dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sowohl die Stromantwort des Kanals, als auch die Kinetik (zeitlicher Verlauf) unabhängig von der vorher angelegten Haltespannung (0mV oder -80mV) ist.

Somit scheint im Wildtypkanal Tok1p nur der Testpuls (+100mV) die Größe und die Kinetik des Kanalstroms zu bestimmen.

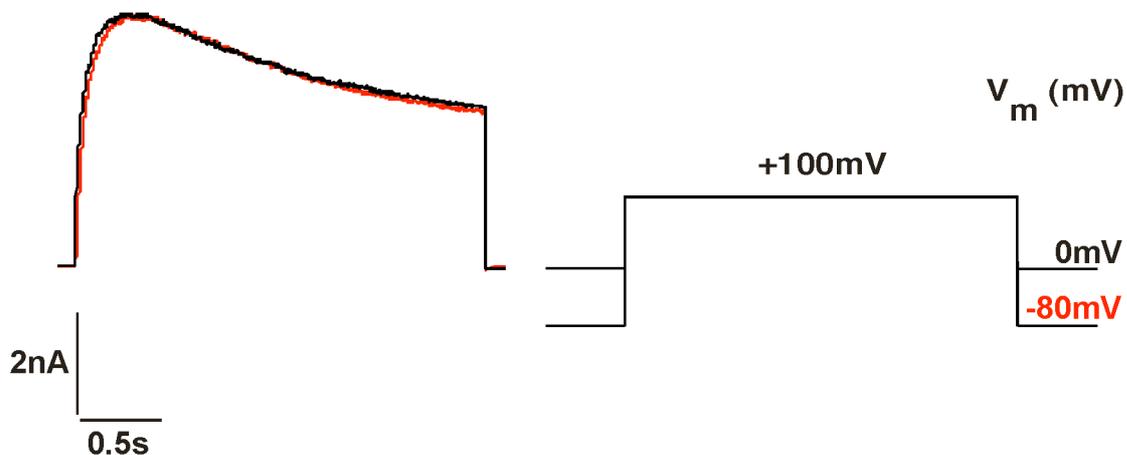


Abbildung 3.10 Abhängigkeit der Stromamplitude und Kanalkinetik von der Haltespannung. Stromantwort des Wildtyp-Kanals Tok1p auf einen +100mV-Puls ausgehend von einer Haltespannung von 0mV (schwarz) bzw. -80mV (rot).

3.4.3 Selektivität des Tok1p-Kanals

Die Wachstumsexperimente zur Selektivität (Abb.3.6) zeigen, dass der Hefestamm PLY246-pTok1p durch Anwesenheit von 490mM NaCl und 10mM CsCl im Medium nicht im Wachstum gehemmt wird. In Konzentrationen von 490mM hemmt Rubidium das Wachstum von PLY246-pTok1p dagegen vollständig. Diese Abweichungen im

Wachstum bei Zusatz unterschiedlicher monovalenter Kationen kann durch elektrophysiologische Experimente erklärt werden. In Abbildung 3.11 sind die Deaktivierungsströme von PLY246-pTok1p in 150mM KCl, NaCl, CsCl und RbCl dargestellt. Bei 150mM RbCl in der Badlösung sind ebenso wie bei 150mM KCl große Einwärtsströme während der Kanal-Deaktivierung zu erkennen. In den Deaktivierungsströmen bei 150mM NaCl bzw. CsCl in der Perfusionslösung zeigen sich solche Einwärtsströme während der Kanal-Deaktivierung nicht. Dies deutet darauf hin, dass Tok1p sowohl für Kalium, als auch für Rubidium, nicht aber für Natrium und Cäsium permeabel ist. Da Tok1p offensichtlich unter bestimmten Bedingungen an der Kaliumaufnahme beteiligt ist, kann angenommen werden, dass die Wachstumshemmung auf Rubidium-Platten durch Rubidiumaufnahme und Vergiftung der Hefezellen zustande kommt.

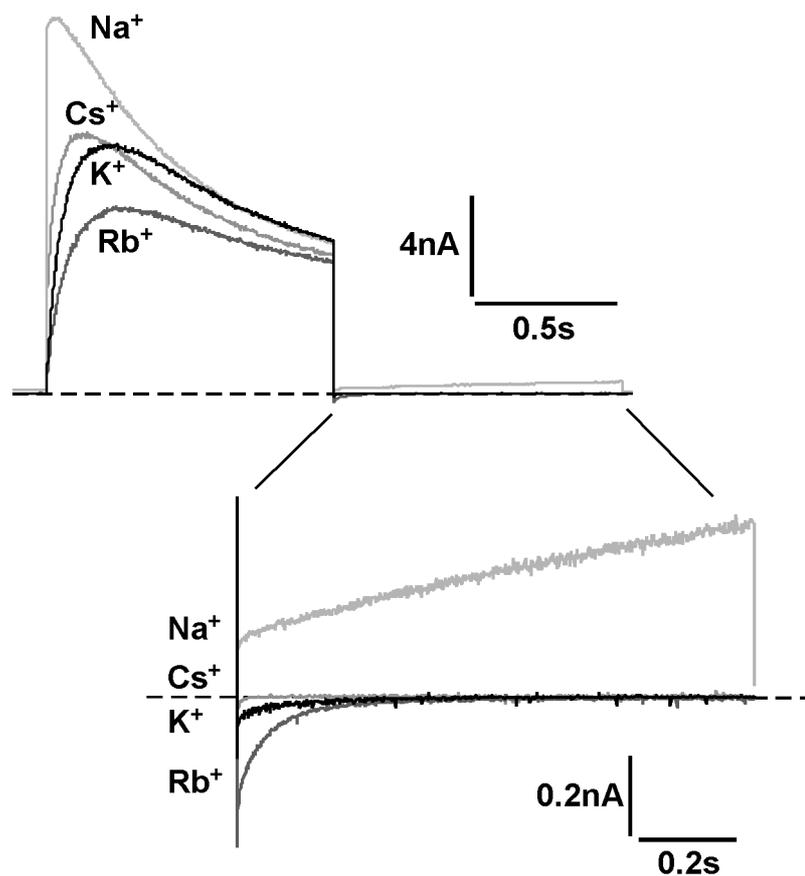


Abbildung 3.11 Deaktivierungsströme des Wildtypkanals Tok1p. Ausgehend von einer Haltespannung von -40mV wurde ein Spannungspuls von $+100\text{mV}$ für 1s an die Membran angelegt, bevor erneut auf eine Haltespannung von -40mV geklemmt wurde. Die Kanal-Deaktivierungsphase ist vergrößert und die Nulllinie gestrichelt dargestellt.

3.5 Funktion negativer Ladungen an der externen Porenöffnung

Bei den beiden Tok1p-Mutanten D292N und D426N, bei denen die negative Ladung am 1. Porenloop bzw. am 2. Porenloop entfernt wurde, sind klare Abweichungen in der Aktivierungs-, Inaktivierungs-, und Deaktivierungskinetik zu erkennen.

Die Mutante D292E zeigte dagegen kaum Abweichungen von der Tok1p-Kinetik. Bei dieser Mutante ist die negative Ladung an Position 292 erhalten geblieben, jedoch um eine CH₂- Gruppe weiter vom Peptidgrundgerüst entfernt .

3.5.1 D292N-Mutante

In Abbildung 3.12 sind die Stromspuren der D292N-Mutante mit dem zugrundeliegenden Standard-Spannungsprotokoll dargestellt.

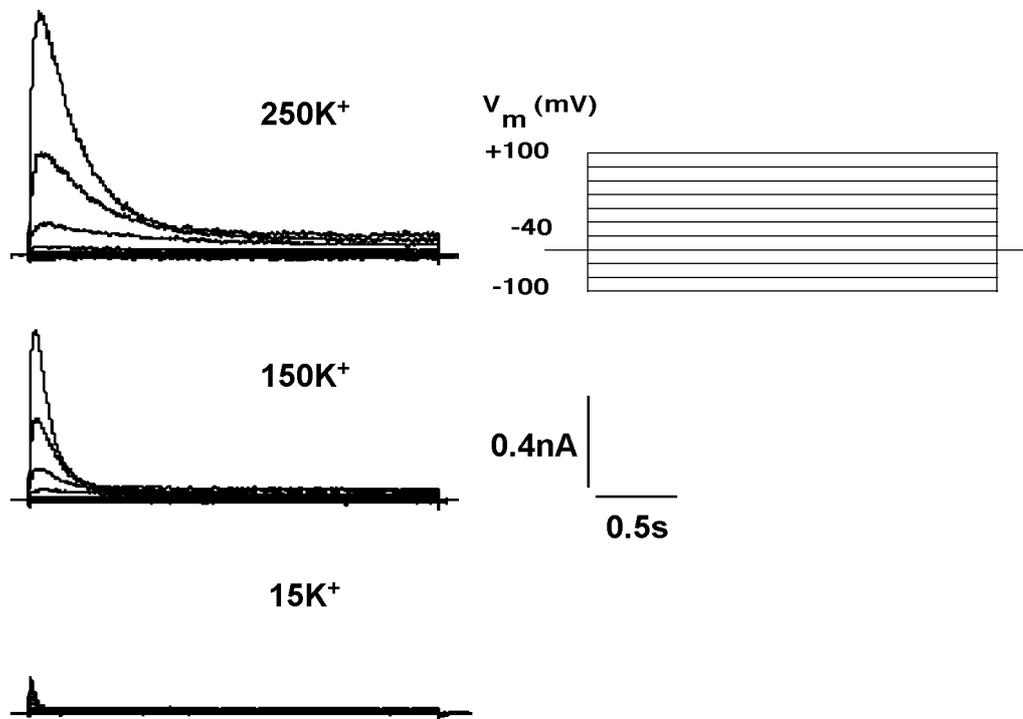


Abbildung 3.12 Ganzzelleableitung PLY246-pTok1(D292N). Spannungsprotokoll (rechts): ausgehend von einer Haltespannung von -40mV wurde die Membran auf Spannungen von $+100\text{mV}$ bis -100mV (in 20mV -Stufen) geklemmt. Nach $2,5\text{s}$ wurde die Membran erneut auf eine Haltespannung von -40mV geklemmt. Zwischen den Pulsen lagen Zeitintervalle von $0,5\text{s}$. Links sind die Stromspuren von PLY246-pTok1(D292N) bei 250 , 150 und 15mM Kalium in der Badlösung dargestellt.

Bei der Mutante D292N sind sehr auffällige Abweichungen von der Tok1p-Kinetik zu erkennen. Es tritt eine schnelle Aktivierung und eine sehr schnelle, fast vollständige Inaktivierung der Kanäle auf. Weiterhin fällt auf, dass mit abnehmender Kaliumkonzentration die Amplitude der Peak-Ströme stark abnimmt, so dass bei

15mM externem Kalium fast keine Ströme mehr erkennbar sind. Beim Wildtypkanal hingegen führte eine Absenkung auf 15mM Kalium zu einer Zunahme der Peak-Stromamplitude (siehe Abb.3.7, für 10mM K^+ gezeigt). Aktivierungszeitkonstanten und Peak-Ströme sind in Abbildung 3.19 bzw. 3.20 im Vergleich zum Wildtyp und den Mutanten D426N und D292E graphisch dargestellt.

Abhängigkeit der Stromamplitude von der Haltespannung

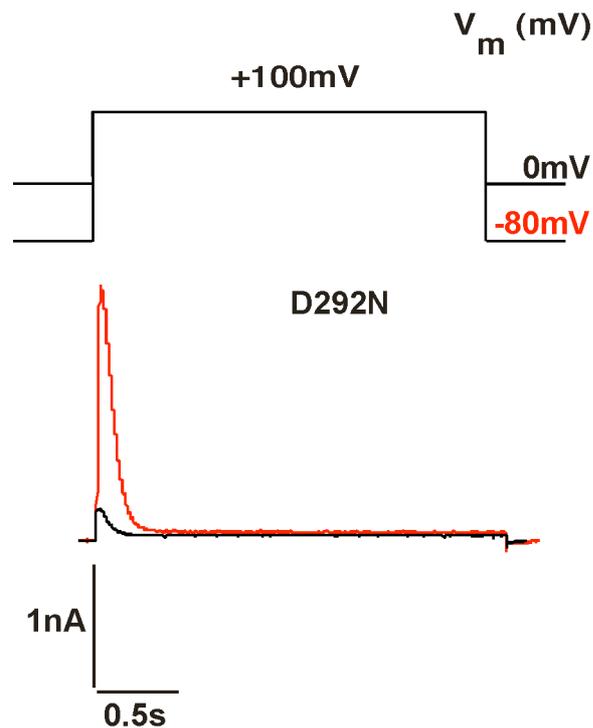


Abbildung 3.13 Abhängigkeit der Stromamplitude und der Kinetik von der Haltespannung. Stromantwort der Tok1(D292N)-Mutante auf einen +100mV-Puls ausgehend von einer Haltespannung von 0mV (schwarz) bzw. -80mV (rot).

Wie oben beschrieben, ist beim Wildtypkanal Tok1p die Stromamplitude und die Kinetik der Stromantwort abhängig von der Testspannung, nicht aber von der zuvor angelegten Haltespannung.

Bei der Mutante D292N zeigt sich, dass die Stromantwort auf einen Spannungspuls von +100mV sehr stark abhängig von der zuvor angelegten Haltespannung ist (Abb.3.13). So ist die Stromamplitude bei -80mV Haltespannung etwa neunmal so groß wie bei einer angelegten Haltespannung von 0mV.

3.5.2 D426N-Mutante

Die bei der Mutante D292N beobachteten Effekte auf die Aktivierung und Inaktivierung sind bei der Mutante D426N ähnlich, jedoch weniger stark ausgeprägt.

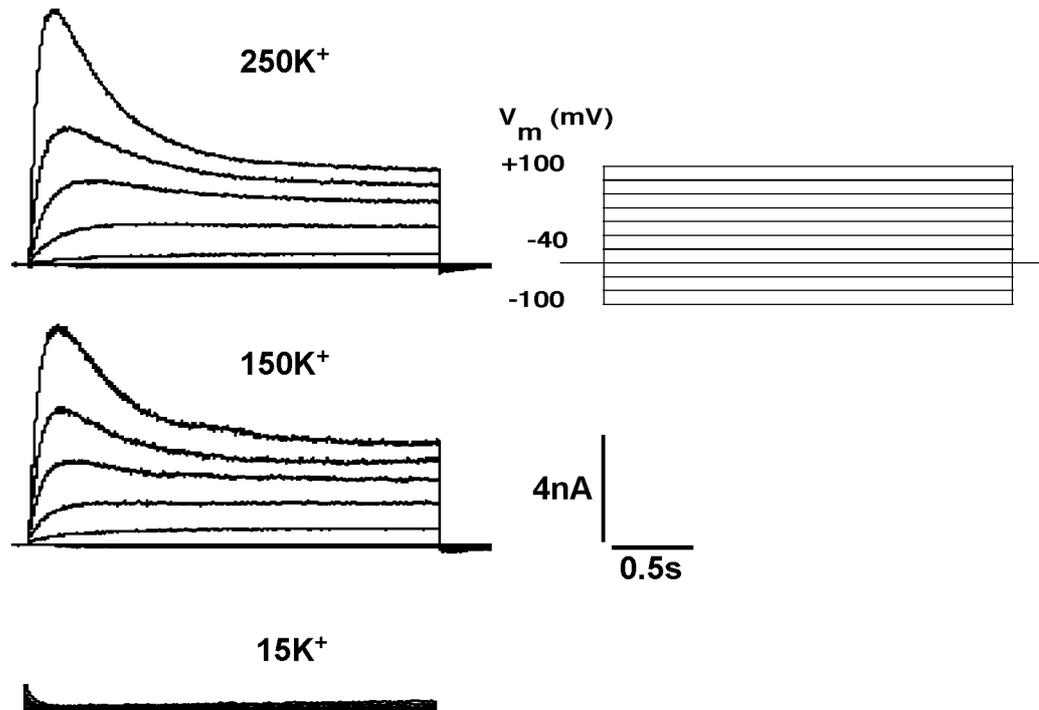


Abbildung 3.14 Ganzzelleableitung PLY246-pTok1(D426N). Spannungsprotokoll: ausgehend von einer Haltespannung von -40mV wurde die Membran auf Spannungen von $+100\text{mV}$ bis -100mV (in 20mV -Stufen) geklemmt. Nach $2,5\text{s}$ wurde die Membran erneut auf eine Haltespannung von -40mV geklemmt. Zwischen den Pulsen lagen Zeitintervalle von $0,5\text{s}$ (rechts). Links sind die Stromspuren von PLY246-pTok1(D426N) bei 250 , 150 und 15mM Kalium in der Badlösung dargestellt.

Bei hohen Kaliumkonzentrationen (250mM und 150mM) ist eine Aktivierung zu beobachten, die deutlich schneller als beim Wildtypkanal, aber wesentlich langsamer als bei der D292N-Mutante ist. Auch die Inaktivierung ist deutlich ausgeprägter als die des Wildtypkanals, aber nicht so stark wie die der Mutante D292N. Ähnlich der D292N-Mutante nehmen hier die Stromamplituden sowohl der Peak-Ströme, als auch der Gleichgewichtsströme mit sinkendem externem Kalium stark ab. Bei 15mM Kalium sind nur noch sehr geringe Ströme messbar.

Selektivität des D426N-Kanals

Bei genauerer Betrachtung der Stromspuren von D426N sind Einwärtsströme während der Kanal-Deaktivierung zu erkennen (Abb. 3.14). Diese Deaktivierungsströme sind in Abbildung 3.15 für verschiedene externe Kationen dargestellt. Die Messung der Deaktivierungsströme von Mutante (D426N) erfolgte bei 150mM KCl, 150mM CsCl, 150mM RbCl oder 150mM NaCl in der Badlösung. Auf eine Haltespannung von -40mV folgte ein Spannungspuls von $+100\text{mV}$ für eine Sekunde, bevor erneut eine Haltespannung von -40mV angelegt wurde. Dabei sind sowohl bei 150mM KCl, als auch bei 150mM RbCl große Einwärtsströme während der Kanal-Deaktivierungsphase zu erkennen.

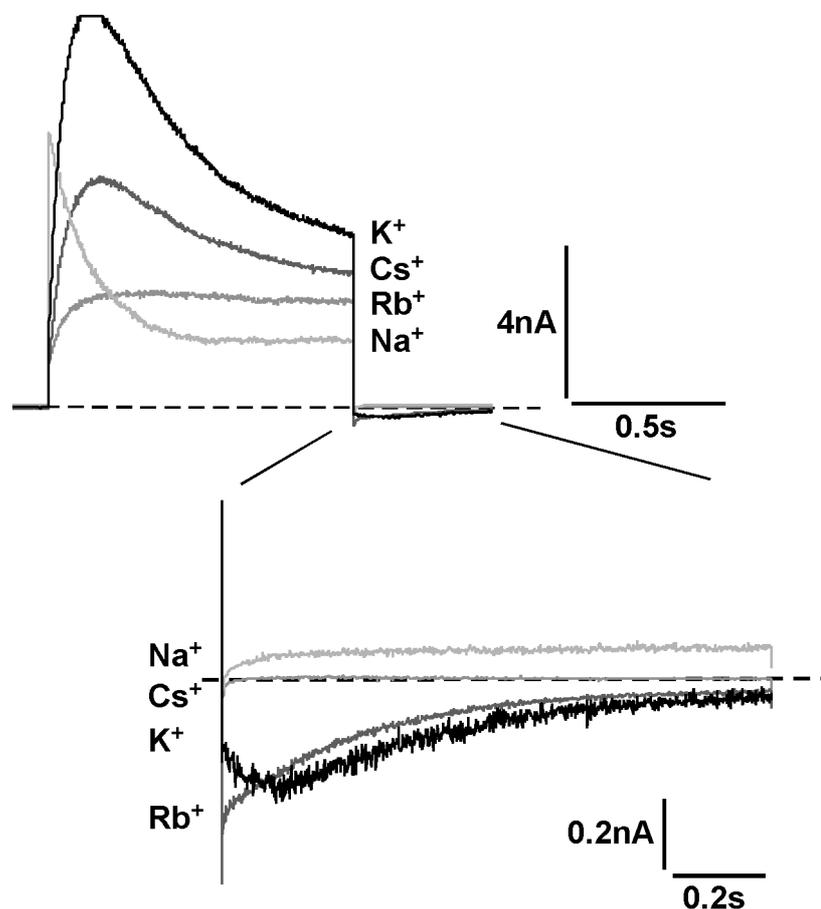


Abbildung 3.15 Deaktivierungsströme der Kanalmutante D426N. Ausgehend von einer Haltespannung von -40mV wurde ein Spannungspuls von $+100\text{mV}$ für 1s an die Membran angelegt, bevor erneut auf eine Haltespannung von -40mV geklemmt wurde. Die Kanal-Deaktivierungsphase ist vergrößert dargestellt. Die Nulllinie ist gestrichelt dargestellt.

Derartige Einwärtsströme in den Deaktivierungsströmen sind weder bei Natrium noch bei Cäsium in der Badlösung zu sehen. Zwar ist die Kinetik der Deaktivierungsströme in der Mutante D426N etwas anders als beim Wildtypkanal, die Selektivität ist jedoch weitgehend unverändert (permeabel für Kalium und Rubidium, impermeabel für Natrium und Cäsium).

3.5.3 Mutante D292E

Die Mutante D292E zeigt kaum Abweichungen von der Tok1p-Kinetik (Abb.3.15). Wie im Wildtyp führt auch hier eine Erniedrigung der externen Kaliumkonzentration zu einer Erhöhung der Stromamplitude. Eine Abweichung zum Wildtypkanal Tok1p tritt ab einer externen Kaliumkonzentration unter 50mM auf. Hier sinken die Stromamplituden rapide ab. Dieser Abfall der Stromamplituden ist auch beim Wildtypkanal Tok1p zu beobachten, jedoch erst bei Kaliumkonzentrationen unter 5mM.

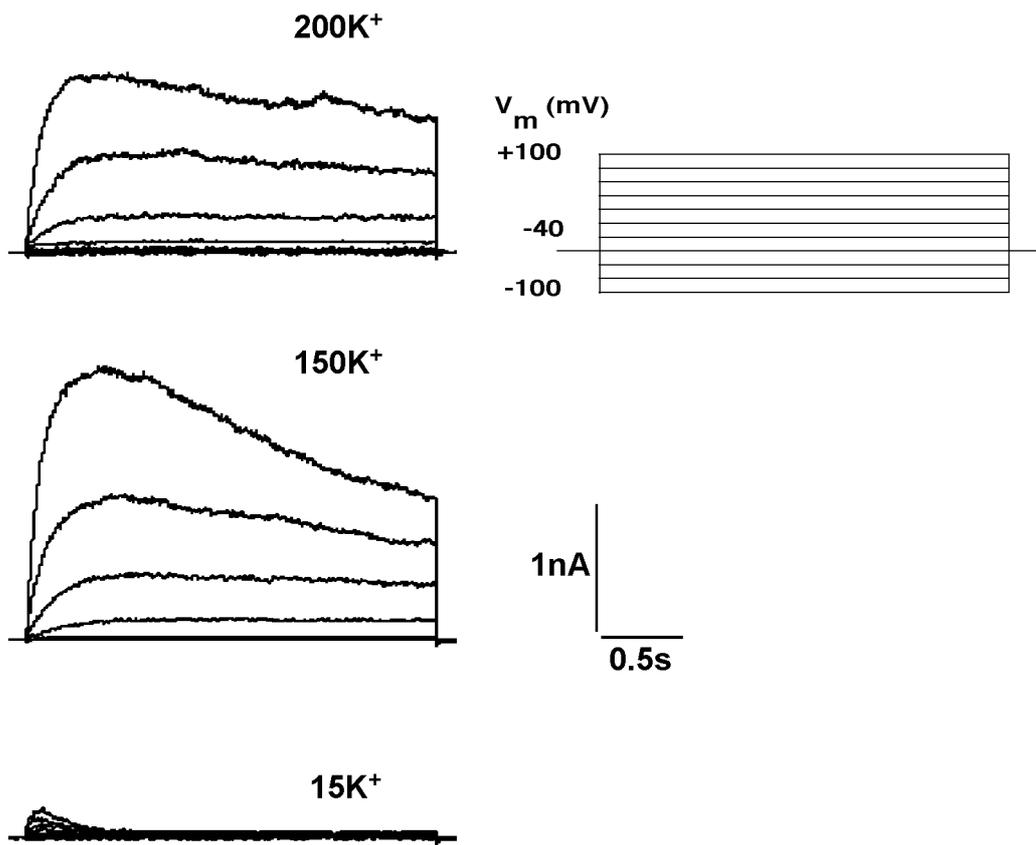


Abbildung 3.16 Ganzzelleableitung PLY246-pTok1(D292E) Spannungsprotokoll: ausgehend von einer Haltespannung von -40mV wurde die Membran auf Spannungen von $+100\text{mV}$ bis -100mV (in 20mV -Stufen) geklemmt. Nach $2,5\text{s}$ wurde die Membran erneut auf -40mV geklemmt. Zwischen den Pulsen lagen Zeitintervalle von $0,5\text{s}$ (rechts). Links sind die Stromspuren von PLY246-pTok1(D292E) bei 200 , 150 und 15mM Kalium in der Badlösung dargestellt.

Auch was die Abhängigkeit der Stromamplituden von der Haltespannung betrifft, weist die D292E-Mutante die Charakteristik des Wildtypkanals auf. Sie zeigt somit ebenfalls keine Abhängigkeit der Peak-Ströme von der Haltespannung.

3.5.4 Analyse der Peak-Ströme

Im Abbildung 3.17 sind die Stromantworten der Mutanten auf einen 100mV-Spannungspuls bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen dargestellt. Anders als beim Wildtypkanal sind die Peak-Ströme der beiden D \square N-Mutanten proportional zur extrazellulären Kaliumkonzentration angeordnet. Das heißt, die Peak-Ströme werden mit abnehmender externer Kaliumkonzentration kleiner (Abb. 3.17, rechts), obwohl die Triebkraft (elektrochemischer Gradient) für den Kaliumausstrom größer wird.

Die Peak-Ströme von D292E verhalten sich wie im Wildtypkanal. Mit abnehmendem externem Kaliumgehalt werden die Peak-Ströme des Wildtypkanals (Abb. 3.7) und der D292E-Mutante größer (Abb. 3.17, links).

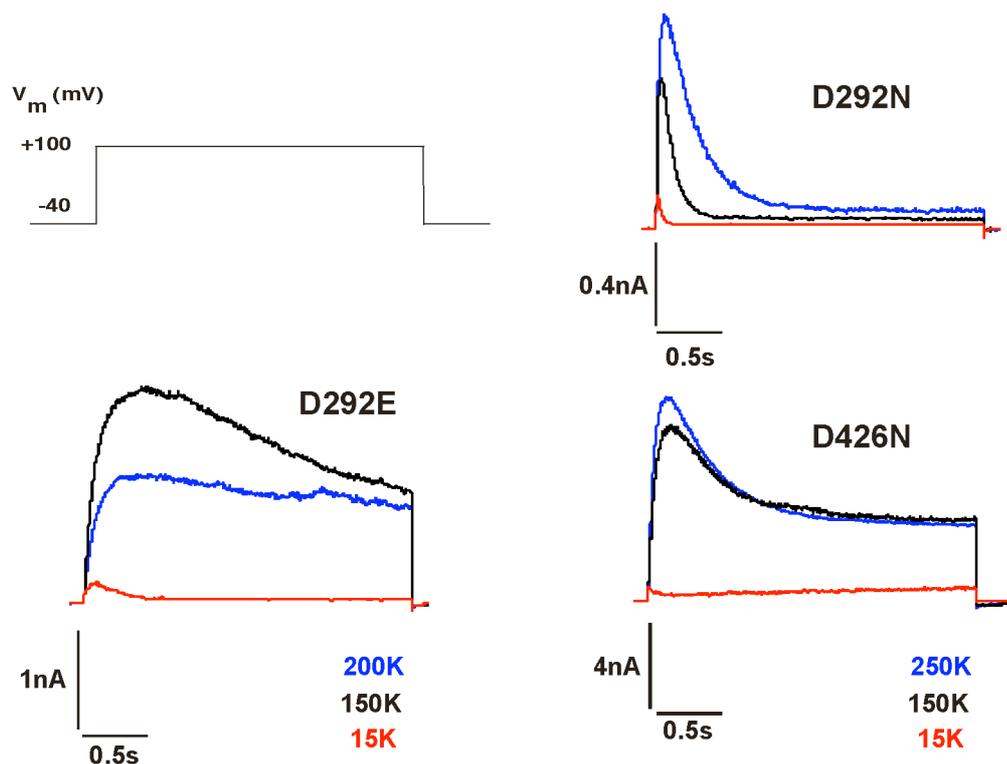


Abbildung 3.17 Peak-Ströme der D \square N(E)-Mutanten. Stromantworten der D \square N(E)-Mutanten auf einen +100mV-Puls bei Kaliumkonzentrationen von 250mM (200mM), 150mM und 15mM Kalium in der Perfusionslösung

Dies gilt bei der D292E-Mutante jedoch nur bis zu einer externen Kaliumkonzentration von \square 50mM Kalium. Darunter kommt es zur rapiden Abnahme

der Peak-Stromamplitude. Beim Wildtypkanal beginnt der starke Abfall der Peak-Ströme erst bei einer externen Kaliumkonzentration unter 5mM.

Die relativen Peak-Ströme von Wildtypkanal und Mutanten sind in Abbildung 3.18 graphisch dargestellt.

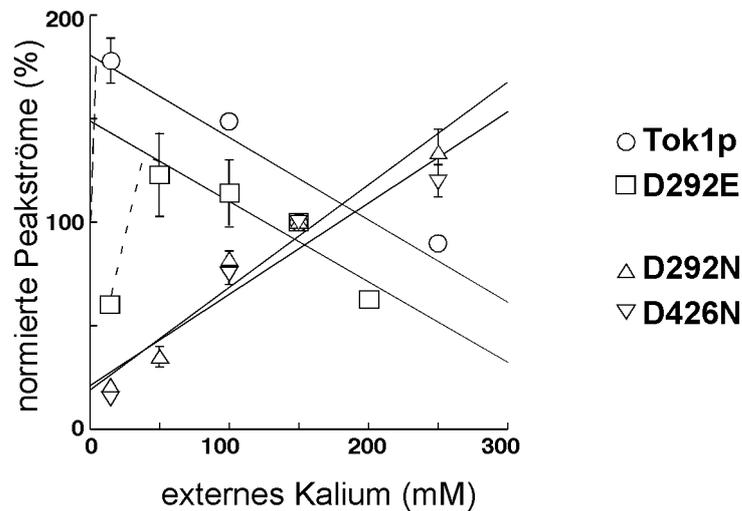


Abbildung 3.18 Normierte Peak-Ströme des Wildtypkanals und der D□ N(E)-Mutanten in Abhängigkeit vom externen Kalium. Die bei den unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen gemessenen Ströme (100mV-Spannungspuls, Haltespannung -40mV) wurden für alle Tok1p-Mutanten auf den jeweiligen Wert bei 150mM Kalium normiert. Die gestrichelten Linien beim Wildtypkanal Tok1p und der Mutante D292E deuten den bei niedrigen Konzentrationen auftretenden Abfall der Peak-Ströme an. Anzahl der durchgeführten Experimente; Tok1p (n=13), D292E (n=4), D292N (n=8) und D426N (n=2).

Dabei wurden die Daten aller Tok1p-Varianten auf den jeweils gemessenen Wert bei 150mM Kalium normiert und durch eine lineare Regression beschrieben. Wenn der negativ geladene Ring wie im Tok1p oder D292E komplett vorhanden ist, reduzieren sich die Kaliumauswärtsströme proportional zur erhöhten Kaliumkonzentration außen. Wenn jedoch 2 Asparaginsäuren an der äußeren Porenöffnung entfernt wurden, wie bei den D□ N-Mutanten, erhöhten sich die Kaliumauswärtsströme mit Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration.

Die ermittelten Steigungen der Regressionsgeraden in Abbildung 3.18 betragen für den Wildtypkanal Tok1p $-0,41\%/mM$ und für die D292E-Mutante $-0,38\%/mM$. Für die D292N- und D426N-Mutante wurden positive Steigung von $0,49\%/mM$ beziehungsweise $0,44\%/mM$ ermittelt.

Die Kaliumabhängigkeit der auswärtsgerichteten Peak-Ströme wird somit durch die Ladungsentfernung der Asparaginsäuren an den Positionen 292 und 426 umgekehrt.

3.5.5 Aktivierungszeitkonstanten

In Abbildung 3.19A ist die Aktivierungszeitkonstante in Abhängigkeit von der Membranspannung bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 150mM aufgetragen.

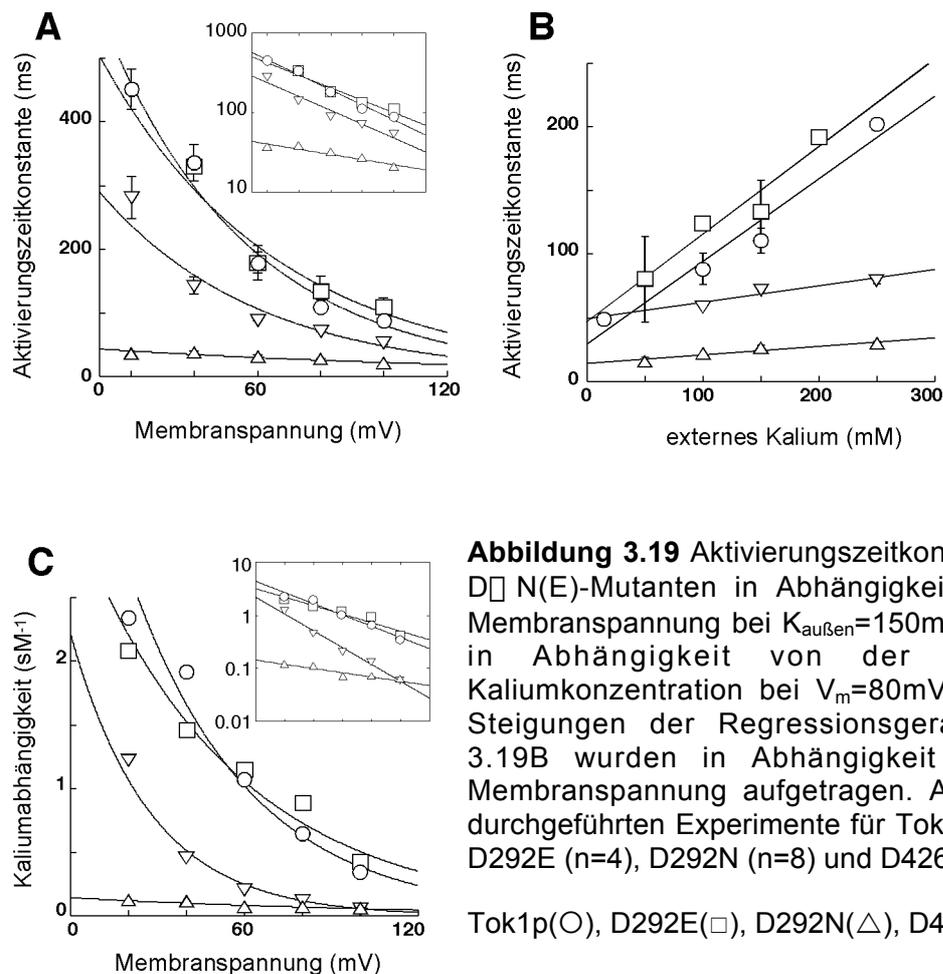


Abbildung 3.19 Aktivierungszeitkonstante der D□ N(E)-Mutanten in Abhängigkeit von der Membranspannung bei $K_{\text{außen}} = 150 \text{ mM}$ (A) und in Abhängigkeit von der externen Kaliumkonzentration bei $V_m = 80 \text{ mV}$ (B). Die Steigungen der Regressionsgeraden aus 3.19B wurden in Abhängigkeit von der Membranspannung aufgetragen. Anzahl der durchgeführten Experimente für Tok1p ($n=13$), D292E ($n=4$), D292N ($n=8$) und D426N ($n=2$).

Tok1p(O), D292E(□), D292N(△), D426N(▽)

Die Auswertung erfolgte wie unter 3.4.1 (Abb.3.9) für den Tok1p-Wildtypkanal beschrieben. Das Verhältnis von Aktivierungszeitkonstante zu Membranspannung lässt sich durch eine Exponentialfunktion beschreiben.

Durch halb-logarithmische Auftragung (siehe Inset) konnten die Steigungen ermittelt und verglichen werden (siehe Tabelle 3.3). Dabei wurde deutlich, dass die Spannungsabhängigkeit (Steigung der Kurve) der D426N und D292E Mutanten nur

unwesentlich von der des Wildtypkanals Tok1p abweicht. Die Kurve für die Mutante D426N ist insgesamt jedoch parallel nach links (zu negativeren Spannungen) verschoben. Die Spannungsabhängigkeit der Mutante D292N weicht hingegen stark vom Wildtypkanal ab.

Abb. 3.19	Steigungen	Wildtyp(O)	D292E(□)	D292N(△)	D426N(▽)
A	τ_b/V_m [1/mV]; exp.	-0.022	-0.018	-0.0075	-0.023
B	$\tau_b/[K^+]$ [s/M]	0.65	0.69	0.065	0.13
C	$\tau_b/[K^+]/V_m$ [1/mV]; exp.	-0.024	-0.020	-0.009	-0.037

Tabelle 3.3 Aus Abb. 3.19 ermittelte Steigungen für den Wildtypkanal und die D□ N(E)-Mutanten

Die Aktivierungszeitkonstante zeigt auch eine deutliche Abhängigkeit von der externen Kaliumkonzentration, wie in Abb. 3.19B exemplarisch für eine Membranspannung von +80mV für Wildtypkanal und Mutanten dargestellt ist. Die Abhängigkeit der Aktivierungszeitkonstante von der extrazellulären Kaliumkonzentration ist linear, mit längeren Aktivierungszeiten bei höheren Kaliumkonzentrationen. Die Kaliumabhängigkeit (Steigungen der Regressionsgeraden) des Wildtypkanals und der Mutante D292E ist etwa gleich, während die der beiden D□ N-Mutanten deutlich reduziert ist. Allerdings ist die Kaliumabhängigkeit, die in Abbildung 3.19B exemplarisch für +80mV dargestellt ist, nicht konstant, sondern hängt von der Membranspannung ab, wie in Abbildung 3.19C zu sehen ist. Hier sind die Kaliumabhängigkeiten (Steigungen aus Analysen wie Abbildung 3.19B) über den gesamten Spannungsbereich von +20mV bis +100mV gegen die Membranspannung graphisch aufgetragen. Während die Kurven für Wildtyp und D292E Mutante nur unwesentlich voneinander abweichen (siehe auch halblogarithmische Auftragung im Inset), zeigen die Kurven für die D292N und für die D426N Mutante einen ganz anderen Verlauf. Beide Mutanten zeigen bei moderaten Membranspannungen (+60mv bis +100mV) nur eine sehr geringe Kaliumabhängigkeit. Während die D292N Mutante diese sehr geringe Kaliumabhängigkeit über den gesamten Spannungsbereich zeigt, steigt die Kaliumabhängigkeit der D426N Mutante bei geringen Membranspannungen (unter +60mV) überproportional stark an.

3.6 Funktion von C- bzw. N-Terminus im Tok1p-Kanal

Nachdem die Wachstumsversuche der Deletionsmutanten angedeutet hatten, dass sowohl die C-terminalen- als auch die N-terminalen-Deletionsmutanten funktionsfähig waren, wurden diese Kanalmutanten in Ganzzelleitungen elektrophysiologisch näher untersucht.

3.6.1 Mutante $\Delta C(K470Stop)$

Die Ganzzellströme der $\Delta C(K470Stop)$ -Mutante, der fast der komplette cytoplasmatische C-Terminus fehlt, zeigten bei 150mM Kalium eine relativ schnelle Aktivierung, keine Inaktivierung und relativ geringe Gleichgewichtsströme (1,15nA bei +100mV).

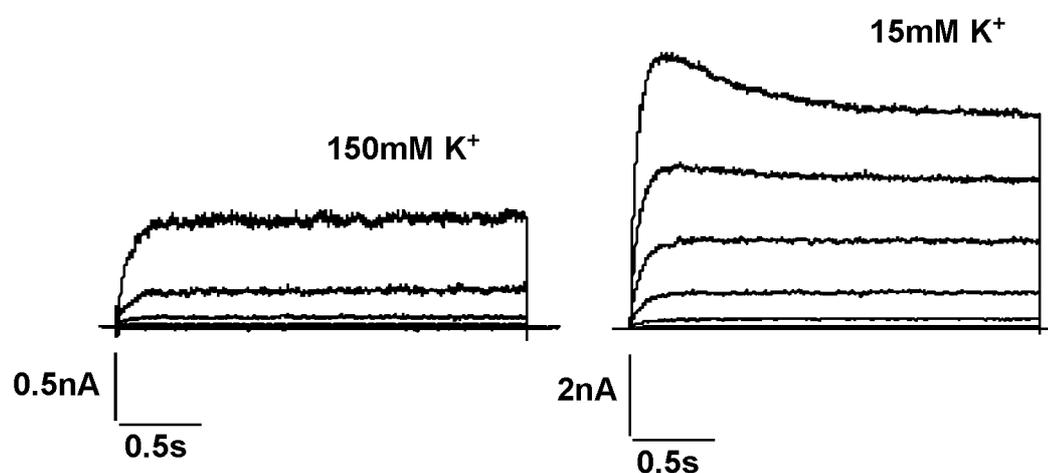


Abbildung 3.20 Ganzzelleitung PLY246-pTok1 $\Delta C(K470Stop)$. Stromantworten der C-terminalen Deletionsmutante $\Delta C(K470Stop)$ auf das Standard-Spannungsprotokoll: ausgehend von einer Haltespannung von $-40mV$ wurde die Membran auf Spannungen von $+100mV$ bis $-100mV$ (in $20mV$ -Stufen) geklemmt. Nach $2,5s$ wurde die Membran erneut auf $-40mV$ geklemmt. Zwischen den Pulsen lagen Zeitintervalle von $0,5s$. Links sind die Stromspuren von PLY246-pTok1 $\Delta C(K470Stop)$ bei $150mM$ Kalium dargestellt, rechts bei $15mM$ Kalium.

Mit $15mM$ Kalium in der Badlösung steigen die Gleichgewichtsströme jedoch stark an ($6,8nA$) und befinden sich dann in der Größenordnung der Tok1p-Gleichgewichtsströme.

Auffällig war bei der C-terminalen Deletionsmutante $\Delta C(K470Stop)$ die deutliche Verschiebung der Strom-Spannungs-Kennlinie zu positiveren Spannungen (Abb.3.21).

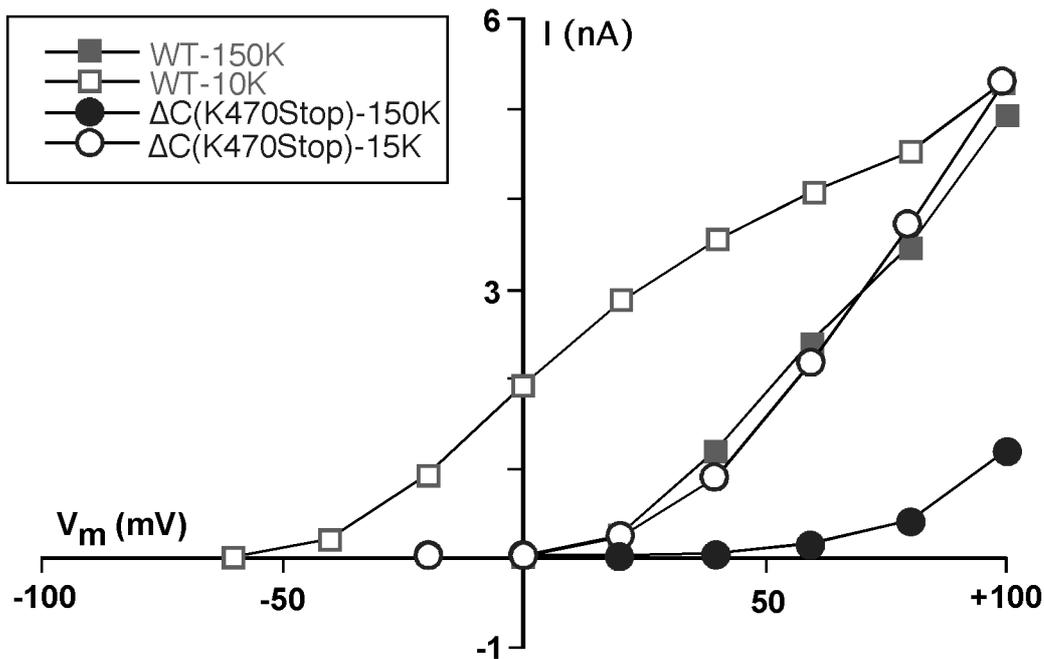


Abbildung 3.21 Strom-Spannungs-Kennlinie aus den in Abbildung 3.20 erhaltenen Gleichgewichtsströmen der C-terminalen Deletionsmutante $\Delta C(K470Stop)$ bei 150mM Kalium und 15mM Kalium (Kreise). Zum direkten Vergleich sind die Daten einer Ganzzellableitung des Wildtypkanals aus Abbildung 3.8 mit aufgetragen (Quadrate).

Neben der Verschiebung der kompletten Strom-Spannungs-Charakteristik zu positiven Spannungen hin, zeigt diese Mutante im Vergleich zum Wildtypkanal auch eine deutlich andere Kinetik in den Deaktivierungsströmen. Während der Wildtypkanal Tok1p keine oder eine extrem langsame zeitabhängige Komponente in den Deaktivierungsströmen zeigt, ist diese Zeitabhängigkeit bei der $\Delta C(K470Stop)$ Mutante sehr ausgeprägt (Abb.3.22).

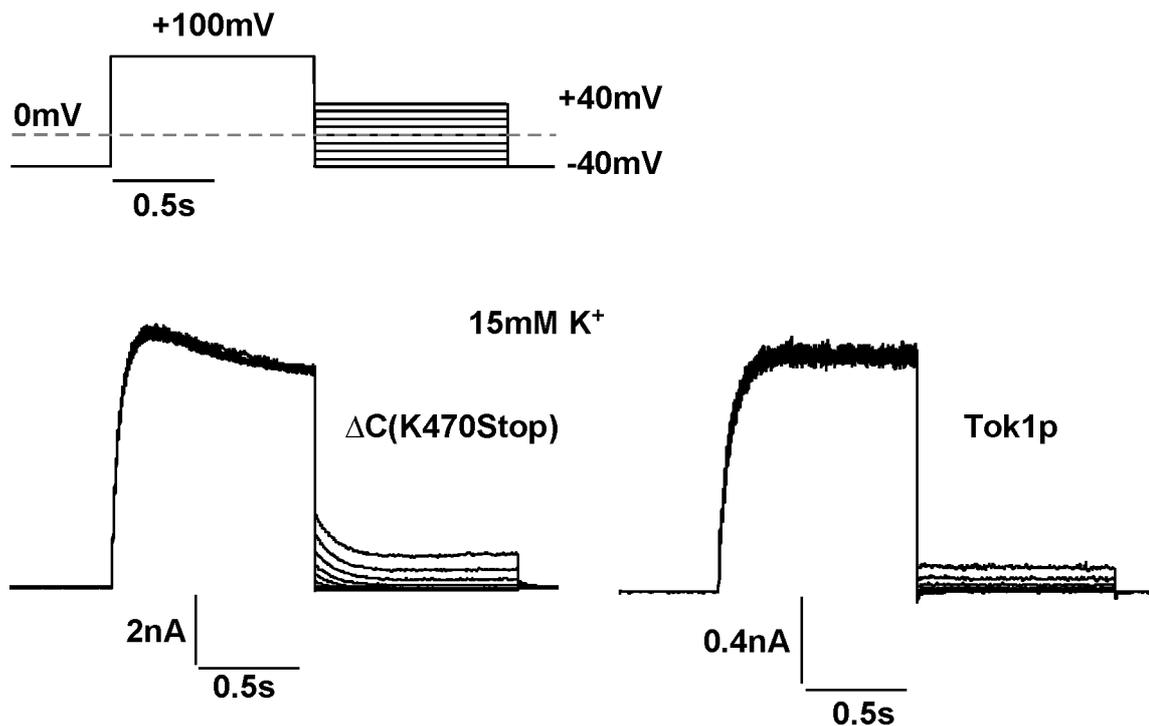


Abbildung 3.22 Deaktivierungsströme der C-terminalen Deletionsmutante $\Delta C(K470Stop)$ Tail-Current-Protokoll (oben): ausgehend von einer Haltespannung von $-40mV$ wurde die Membran auf eine Spannung von $+100mV$ geklemmt. Nach $1s$ wurde die Membran auf Spannungen von $+40mV$ bis $-40mV$ geklemmt (in $10mV$ Schritten). Zwischen den Pulsen lagen Zeitintervalle von $0,5s$. Rechts sind die Deaktivierungsströme der C-terminalen Deletionsmutante $\Delta C(K470Stop)$ und links die des Wildtypkanals Tok1p bei $15mM$ Kalium zu sehen.

3.6.2 Mutante $\Delta C(L582Stop)$

Die Mutante $\Delta C(L582Stop)$, die einen verkürzten C-Terminus von 112 Aminosäuren besitzt, zeigt ganz ähnliche Charakteristika wie die oben beschriebene Mutante $\Delta C(K470Stop)$ ohne C-Terminus. Auch hier ist in $150mM$ Kalium keine Inaktivierung zu sehen und die Gleichgewichtsströme sind mit $1,7nA$ bei $+100mV$ relativ klein (vergleichbar zur Mutante $\Delta C(K470Stop)$, siehe 3.6.1). Durch Absenkung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf $15mM$ steigt auch hier die Stromamplitude stark an und eine leichte Inaktivierung tritt auf.

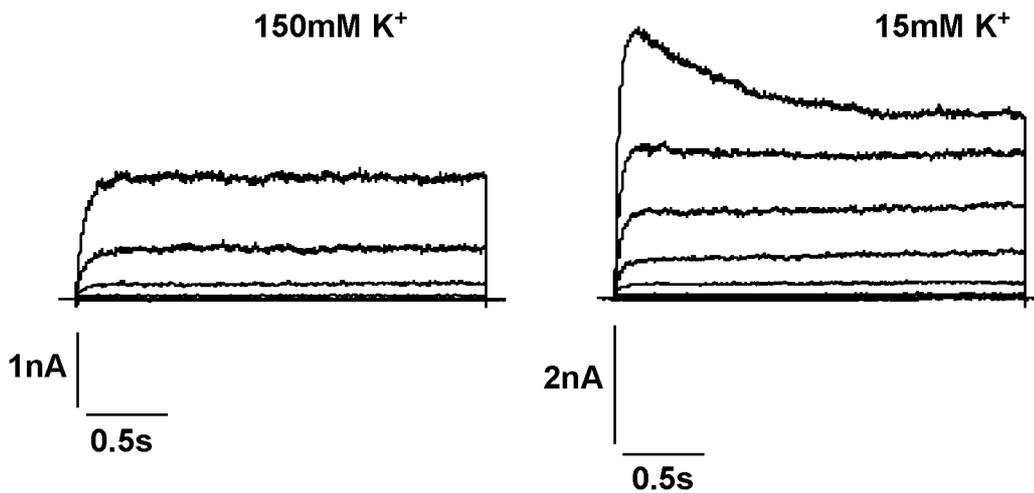


Abbildung 3.23 Ganzzelleableitung PLY246-pTok1 Δ C(L582Stop). Stromantworten der C-terminalen Deletionsmutante Δ C(L582Stop) auf das Standard-Spannungsprotokoll: ausgehend von einer Haltespannung von -40 mV wurde die Membran auf Spannungen von $+100$ mV bis -100 mV (in 20 mV-Stufen) geklemmt. Nach $2,5$ s wurde die Membran erneut auf -40 mV geklemmt. Zwischen den Pulsen lagen Zeitintervalle von $0,5$ s. Links sind die Stromspuren von PLY246-pTok1 Δ C(L582Stop) bei 150 mM Kalium dargestellt, rechts bei 15 mM Kalium.

3.6.3 Mutante Δ C(L674Stop)

Die Stromspuren der Mutante Δ C(L674Stop), die noch den größten Teil des C-Terminus besitzt, weisen große Ähnlichkeiten zu denen des Wildtypkanals Tok1p auf.

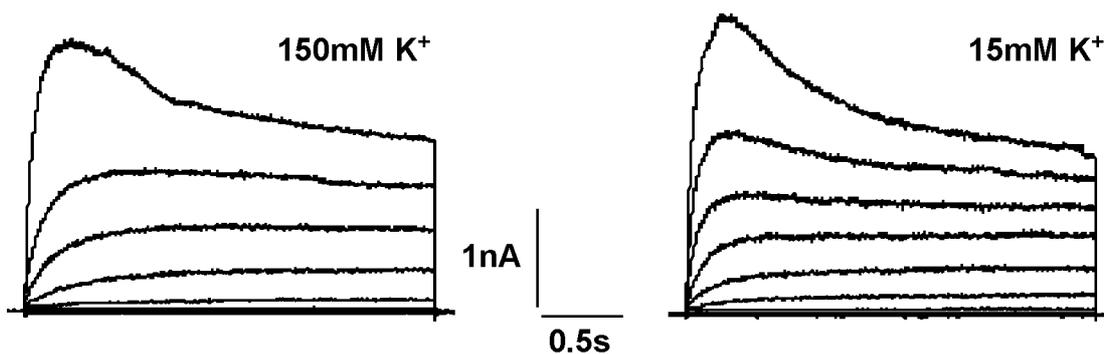


Abbildung 3.24 Ganzzelleableitung PLY246-pTok1 Δ C(L674Stop). Stromantworten der C-terminalen Deletionsmutante Δ C(L674Stop) auf das Standard-Spannungsprotokoll: ausgehend von einer Haltespannung von -40 mV wurde die Membran auf Spannungen von $+100$ mV bis -100 mV (in 20 mV-Stufen) geklemmt. Nach $2,5$ s wurde die Membran erneut auf -40 mV geklemmt. Zwischen den Pulsen lagen Zeitintervalle von $0,5$ s. Links sind die Stromspuren von PLY246-pTok1 Δ C(L674Stop) bei 150 mM Kalium dargestellt, rechts bei 15 mM Kalium.

Bei dieser Mutante sind bei 150mM Kalium und einer Spannung von +20mV und bei 15mM Kalium sogar bei einer Spannung von -20mV wieder signifikante Auswärtsströme erkennbar. Das spricht für eine deutliche Verschiebung der Strom-Spannungs-Kennlinie (IV-Kennlinie) zu negativen Spannungen bei Absenkung der extrazellulären Kaliumkonzentration, wie das auch beim Wildtypkanal zu erkennen war.

Auffällig ist, dass die Peak-Stromamplitude bei einem +100mV Spannungspuls in 150mM Kalium und in 15mM Kalium ungefähr gleich sind. Die Peak-Stromamplituden der Mutante $\Delta C(L674Stop)$ sind in 15mM externem Kalium um den Faktor 1,2 größer als in 150mM externem Kalium. Beim Wildtypkanal konnte die Peak-Stromamplitude bei Absenkung der Kaliumkonzentration um den Faktor zwei erhöht werden. Die beiden C-terminalen Deletionsmutanten $\Delta C(K470Stop)$ und $\Delta C(L582Stop)$ reagierten auf eine Absenkung der Kaliumkonzentration in der Badlösung mit einer Erhöhung der Peak-Stromamplitude um Faktor sechs beziehungsweise drei.

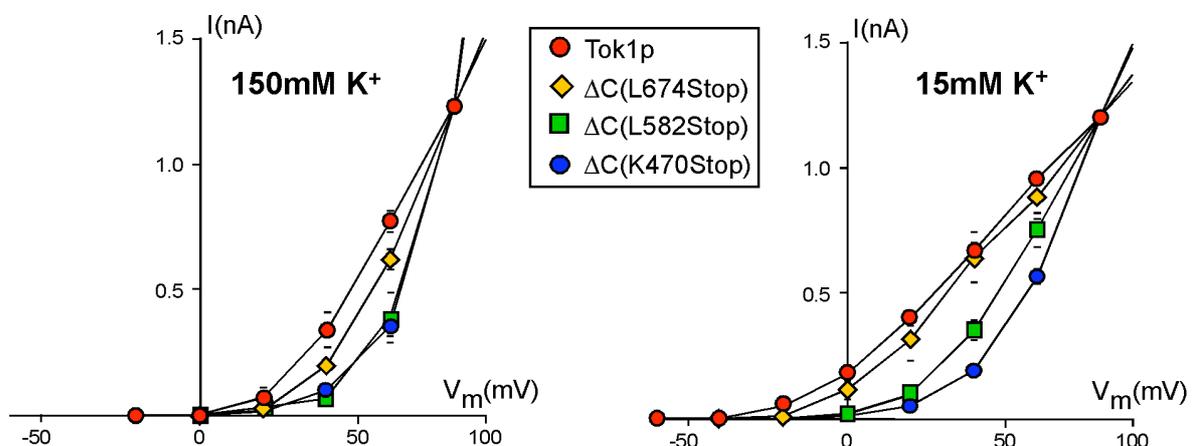


Abbildung 3.25 Strom-Spannungs-Kennlinien des Wildtypkanals Tok1p und der C-terminalen Deletionsmutanten. Dargestellt sind die auf +80mV normierten IV-Kurven bei 150mM Kalium (links) und 15mM Kalium (rechts) mit Standardabweichung ($n=4$ für Tok1p, $\Delta C(L582Stop)$ und $\Delta C(K470Stop)$; $n=2$ für $\Delta C(L674Stop)$).

Aus einem Vergleich der IV-Kennlinien von Tok1p und den drei C-terminalen Deletionsmutanten ist ersichtlich, dass die IV-Kurve der Mutante $\Delta C(L674Stop)$ durch Erniedrigung der externen Kaliumkonzentration zu negativen Spannungen verschoben wird, ähnlich wie beim Wildtypkanal Tok1p. Dagegen sind die IV-Kennlinien der beiden Mutanten $\Delta C(K470Stop)$ und $\Delta C(L582Stop)$ nicht nur nach rechts, zu positiven Spannungen verschoben, sondern sie reagieren auch nur noch

sehr schwach auf Veränderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration (Abb.3.25).

3.6.4 Abhängigkeit der Aktivierung der C-terminalen Deletionsmutanten von der Membranspannung

An den Stromspuren der beiden C-terminalen Deletionsmutanten $\Delta C(K470Stop)$ und $\Delta C(L582Stop)$ fiel auf, dass in der Kinetik der Kanalaktivierung fast keine Abhängigkeit von der Membranspannung mehr zu erkennen war (Abb.3.20 und 3.23). Dieser Eindruck wird durch die graphische Darstellung der Aktivierungszeitkonstanten von Tok1p und der drei C-terminalen Deletionsmutanten in Abhängigkeit von der Membranspannung bei 150mM Kalium eindrucksvoll bestätigt (Abbildung 3.26).

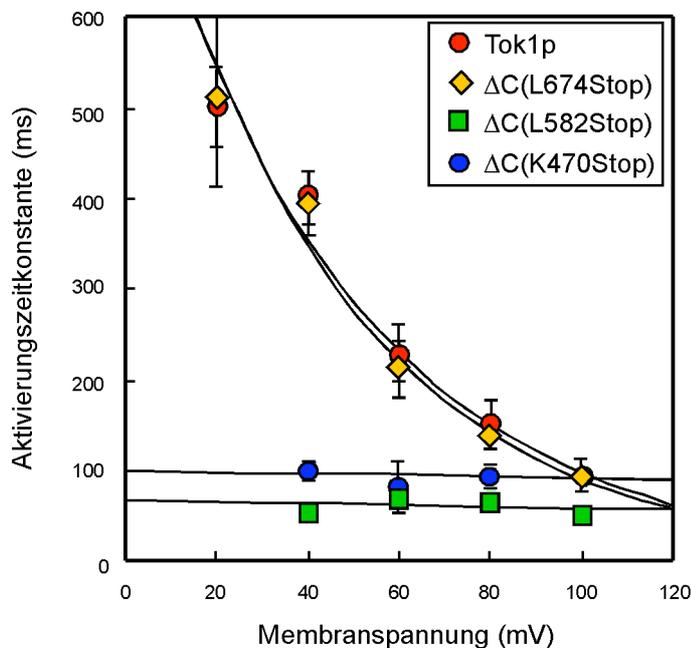


Abbildung 3.26

Aktivierungszeitkonstanten in Abhängigkeit von der Membranspannung bei 150mM Kalium für den Wildtypkanal Tok1p und die C-terminalen Deletionsmutanten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n=4).

Die Auswertung erfolgte wie unter 3.4.1 (Abb.3.9) für den Tok1p-Wildtypkanal beschrieben.

Die Abhängigkeit der Aktivierungszeitkonstante von der Membranspannung lässt sich durch eine Exponentialfunktion beschreiben. Es wird deutlich, dass die Aktivierungszeitkonstante sowohl beim Wildtypkanal Tok1p, als auch bei der Mutante $\Delta C(L674Stop)$ sehr stark spannungsabhängig ist, während diese Abhängigkeit bei den beiden C-terminalen Deletionsmutanten $\Delta C(K470Stop)$ und $\Delta C(L582Stop)$ fast vollständig verloren geht. Für die Mutante $\Delta C(K470Stop)$ wurde eine Steigung von $-0,001$ und für die Mutante $\Delta C(L582Stop)$ eine Steigung von $-0,002$ ermittelt. Die

Spannungsabhängigkeit von Wildtypkanal und Mutante $\Delta C(L674Stop)$ ist dagegen mit einer Steigung von $-0,022$ etwa 10 bis 20 mal so stark.

Der Verlust der Spannungsabhängigkeit in der Aktivierung der Mutanten $\Delta C(K470Stop)$ und $\Delta C(L582Stop)$ weist darauf hin, dass im C-Terminus zwischen Aminosäure L582 und L674, eine Art Spannungssensor lokalisiert ist.

3.6.5 Bedeutung des N-Terminus für die Funktion von Tok1p

Wie die Wachstumsversuche zeigten, ist die Mutante Tok1p(I62Start) auch nach Deletion des gesamten N-Terminus noch in der Lage, voll funktionsfähige Kanäle zu bilden.

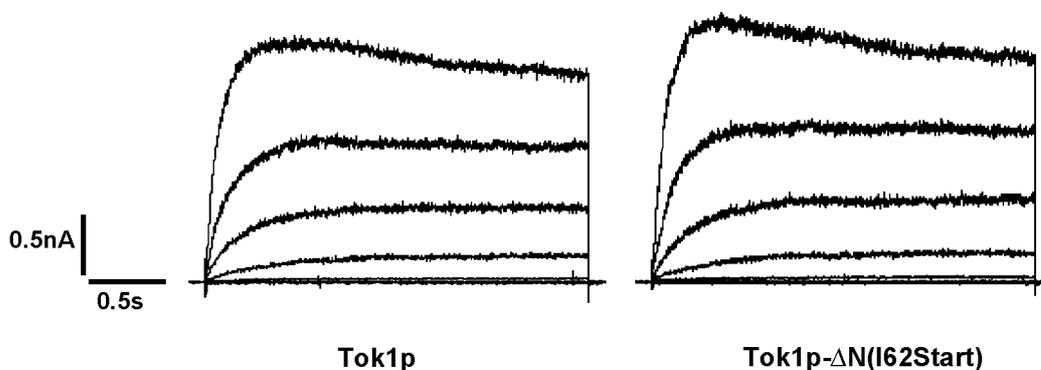


Abbildung 3.27 Ganzzelleableitung PLY246-pTok1 $\Delta N(I62Start)$ nach dem Standard-Spannungsprotokoll. Links sind die Stromspuren von PLY246-pTok1p bei 150mM Kalium dargestellt und rechts die der N-terminalen Deletionsmutante $\Delta N(I62Start)$.

Auch die Ganzzelleableitung der $\Delta N(I62Start)$ -Kanalmutante bestätigen die volle Funktionsfähigkeit des verkürzten Kanalproteins (Abb.3.27). So zeigen die Stromkurven der Mutante ganz ähnliche Charakteristika wie man sie beim Wildtypkanal Tok1p vorfindet.

3.7 Auswirkungen von Mutationen in der Kaliumkanal-Signatursequenz GY(L)G

Die Fähigkeit der Porenloop-Mutanten auf 10mM Kalium wachsen zu können, deutet darauf hin, dass eine veränderte Anordnung der beiden Aminosäuren Leucin (L290) und Tyrosin (Y424) in der Porenregion keinen Funktionsverlust des Kanalproteins zur Folge hat.

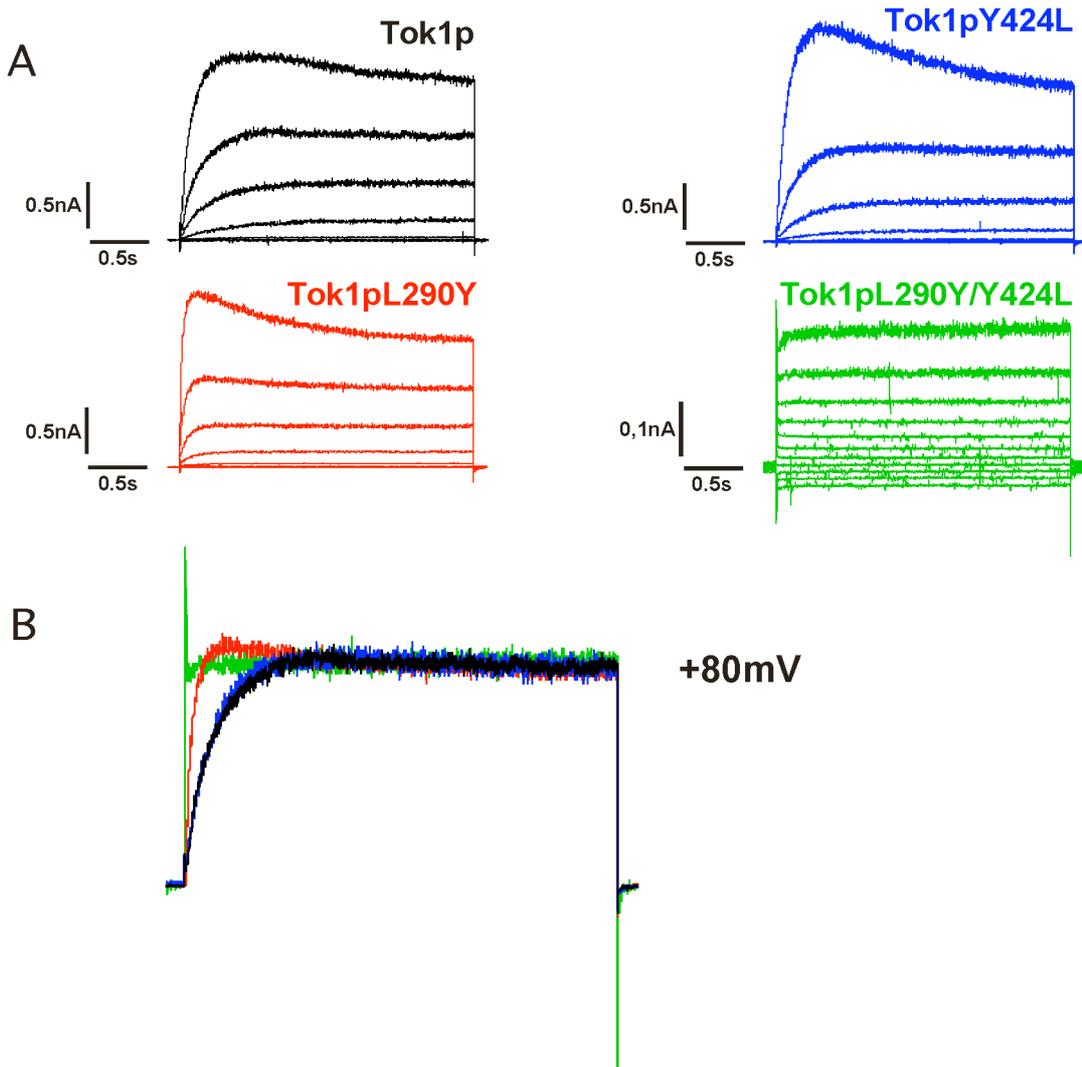


Abbildung 3.28 Ganzzelleableitungen der GY(L)G-Porenloopmutanten. **A.** Ganzzelleableitungen der Mutanten Tok1p(L290Y), Tok1p(Y424L) und Tok1p (L290Y/Y424L) im direkten Vergleich zum Wildtypkanal Tok1p unter Verwendung des Standard-Spannungsprotokolls. **B.** Dargestellt sind die +80mV Stromspuren der unter 3.28A gemessenen Tok1p-Mutanten. Diese wurden auf den Gleichgewichtsstrom des Wildtypkanals Tok1p (schwarz) normiert.

In Ganzzelleableitungen zeigen die drei mutierten Kanäle einen spannungsabhängigen Kaliumauswärtsstrom mit den charakteristischen Merkmalen des Tok1p-Wildtypkanals. Jedoch weisen die Mutanten Tok1p(L290Y) und Tok1p(L290Y/Y424L) im Vergleich zum Tok1p eine viel schnellere Aktivierungskinetik auf, während die Mutante Tok1p(Y424L) kaum von der Aktivierungskinetik des Wildtypkanals Tok1p abweicht (Abb. 3.28).

Bei der Doppelmutation L290Y/Y424L fällt außerdem auf, dass vermehrt instantane Ströme auftreten und die Stromamplituden sehr viel kleiner ausfallen.

3.8 Simulation der Stromspuren

Mit dem PulseSim-Programm von Heka wurde eine Simulation von Stromspuren mit dem kinetischen 3-Zustandsmodell durchgeführt (siehe 2.8). Bei diesem Modell gehen wir davon aus, dass der Tok1p-Kanal in drei diskreten Zuständen vorliegen kann, im offenen (o), im geschlossenen (g) und im inaktiven (i) Zustand. Dabei kann der Kanal vom geschlossenen in den offenen und weiter in den inaktiven Zustand übergehen und auch in die entgegengesetzte Richtung. Für die Simulation wurden die gleichen Reaktionsbedingungen wie bei den Ganzzelleableitungen zu Grunde gelegt. Für die Simulation der Stromantwort des Wildtypkanals Tok1p auf einen +100mV-Puls bei 50mM externem Kalium, wurden die in Tabelle 2.11 angegebenen Parameter beziehungsweise Variablen in das 3-Zustandsmodell eingesetzt. Zur Simulation der Mutante D292N wurde die Variable der Kaliumkonzentration im Vergleich zum Wildtypkanal um Faktor den 10 reduziert, um so dem reduzierten elektrostatischen Effekt der negativen Ladungen Rechnung zu tragen. Gleichzeitig wurde die Kaliumabhängigkeit des Inaktivierungsschrittes erhöht (Parameter dep2 wurde von 2 auf 1 erniedrigt) und die Anzahl der Kanäle in der Simulation der D292N-Mutante von 950 auf 750 abgesenkt.

Die auf diesen Grundlagen durchgeführten Simulationen sind in den Abbildungen 3.29 und 3.31 zu sehen.

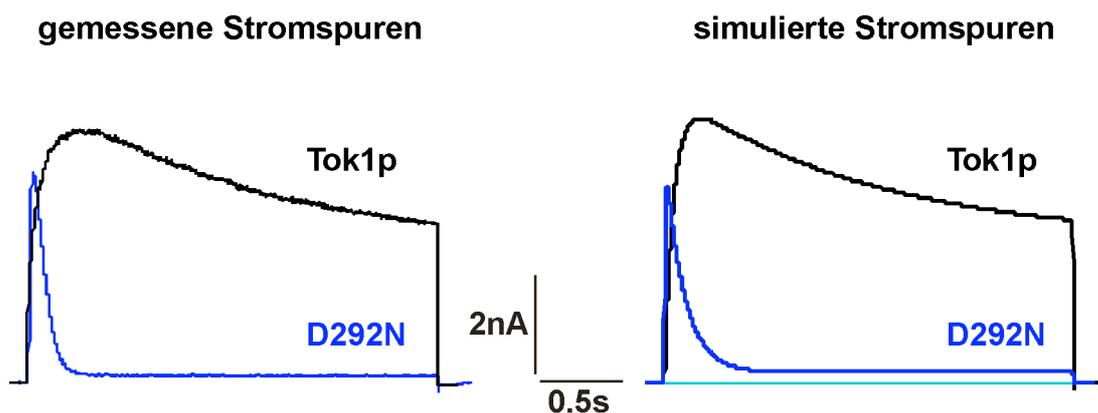


Abbildung 3.29 Simulation der Stromspuren von Tok1p und Tok1p(D292N) mit dem kinetischen 3-Zustandsmodell. Gemessene Stromspuren des Wildtypkanals Tok1p und der Tok1p-Mutante(D292N) auf einen Spannungspuls von +100mV bei 50mM Kalium (links). Mit dem kinetischen 3-Zustandsmodell simulierte Stromspuren des Wildtypkanals Tok1p und der Tok1p-Mutante(D292N) (rechts).

In Abbildung 3.29 sind links die gemessenen Stromspuren des Wildtypkanals Tok1p und der Tok1p(D292N)-Mutante auf einen Spannungspuls von +100mV bei 50mM

Kalium dargestellt. Rechts sind die unter denselben Bedingungen mit dem PulseSim-Protokoll simulierten Stromspuren zu sehen. Durch die Simulation kann die sehr schnelle Aktivierung und die extrem schnelle und fast vollständige Inaktivierung der Stromamplitude der D292N-Mutante nachgestellt werden.

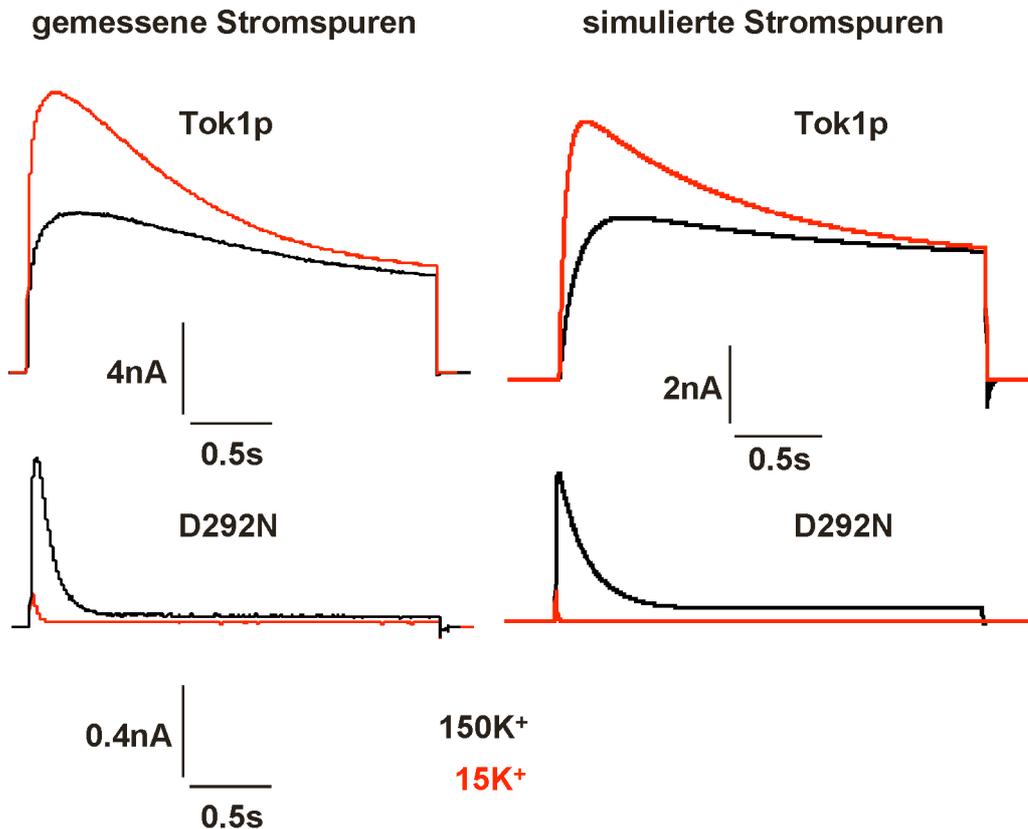


Abbildung 3.30 Simulation der Stromspuren von Tok1p und Tok1p(D292N) mit dem kinetischen 3-Zustandsmodell bei niederen (15mM K^+) und hohen (150mM K^+) externen Kaliumkonzentrationen. Gemessene Stromspuren (links) des Wildtypkanals Tok1p und der Tok1p-Mutante(D292N) auf einen Spannungspuls von +100mV bei 150mM (schwarz) und 15mM (rot) externem Kalium. Mit dem kinetischen 3-Zustandsmodell simulierte Stromspuren des Wildtypkanals Tok1p und der Tok1p-Mutante(D292N) (rechts).

Auch die Unterschiede in den Peak-Stromamplituden, die nach absenken der extrazellulären Kaliumkonzentration von 150mM Kalium auf 15mM Kalium auftreten, konnten für den Wildtypkanal Tok1p und den mutierten Kanal D292N mit dem 3-Zustandsmodell simuliert werden (Abb.3.30). Für die Simulation der Stromspuren in Abbildung 3.30, wurden ebenfalls die Parameter aus Tabelle 2.11 eingesetzt, jedoch mit folgenden Abweichungen in den Parametern der Kaliumkonzentration (Tabelle 3.4).

Parameter	Tok1p	Tok1p	D292N	D292N
	150mM K ⁺	15mM K ⁺	150mM K ⁺	15mM K ⁺
K = [K ⁺]	0.03	0.003	0.035	0.001

Tabelle 3.4 Zur Simulation der Stromspuren in Abbildung 3.30 veränderte Parameter für die Kaliumkonzentration. Die restlichen Parameter entsprechen den in Tabelle 2.11 angegebenen.

Wie in Abbildung 3.2 gezeigt wurde, ist die Stromamplitude des Wildtypkanals nicht von der Haltespannung abhängig. Dies konnte auch in der Simulation des Wildtypkanals mit dem PulseSim-Programm gezeigt werden (Abb. 3.31A). Es ist zu erkennen, dass die simulierten Stromkurven sehr gut mit den gemessenen Stromkurven übereinstimmen. Eine zweite Simulation wurde mit der Mutante D292N durchgeführt (Abb. 3.31B). In dieser Simulation zeigt die Mutante D292N ebenso eine starke Abhängigkeit von der angelegten Haltespannung, wie das in den gemessenen Stromspuren zu erkennen war.

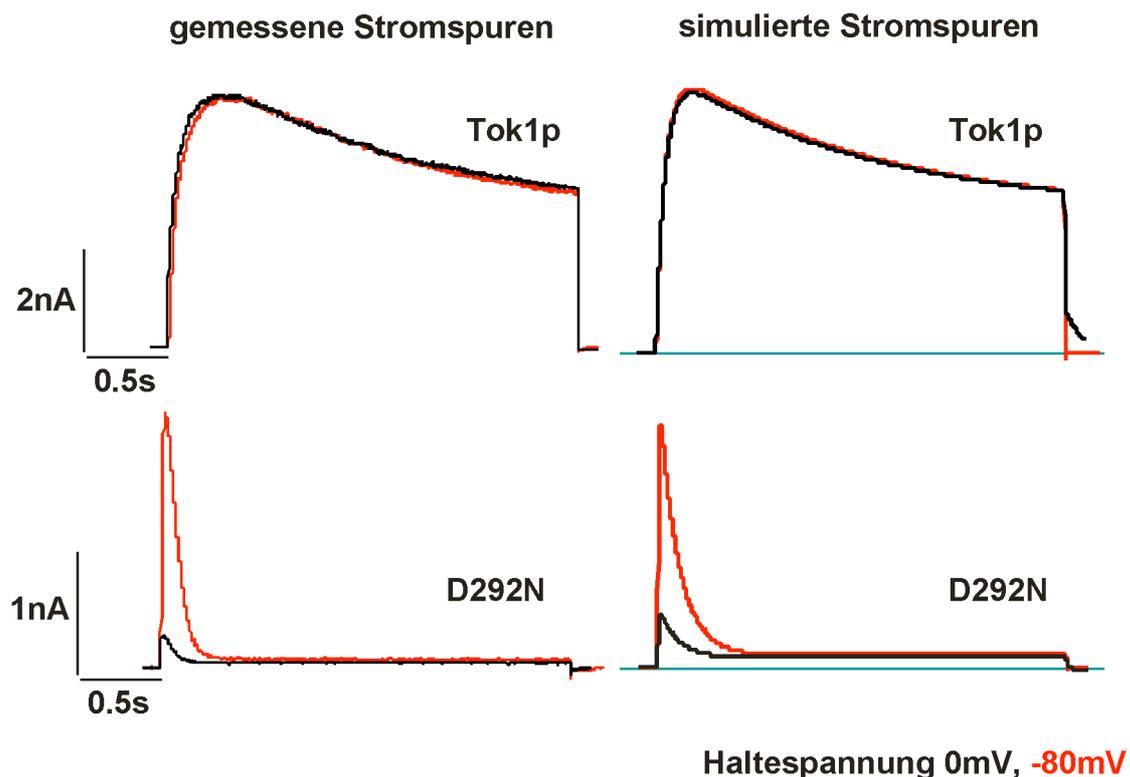


Abbildung 3.31 Simulation der Abhängigkeit der Stromspuren von der Haltespannung für Tok1p und D292N mit dem kinetischen 3-Zustandsmodell. Real gemessene Stromantworten des Wildtypkanals Tok1p und der Tok1p-Mutante(D292N) auf einen Spannungspuls von +100mV bei 50mM Kalium ausgehend von einer Haltespannung von 0mV (schwarz) und -80mV (rot) (links). Mit dem kinetischen 3-Zustandsmodell simulierte Stromspuren des Wildtypkanals Tok1p und der Tok1p-Mutante(D292N) auf einen Spannungspuls von +100mV bei 50mM Kalium ausgehend von einer Haltespannung von 0mV (schwarz) und -80mV (rot) (rechts).

Insgesamt werden die grundlegenden Eigenschaften des Wildtypkanals Tok1p und des mutierten Kanals D292N durch das oben vorgestellte serielle 3-Zustandsmodell mit spannungsabhängigen Übergängen zwischen geschlossen (k_{co}) und offen (k_{oc}), sowie einer (inversen) Kaliumabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k_{co} und k_{oi} sehr gut beschrieben. Der fundamentale Unterschied zwischen Wildtypkanal Tok1p und dem mutierten Kanal D292N liegt in der lokalen, extrazellulären Kaliumkonzentration, die durch die Neutralisation der elektrostatisch wirkenden negativ geladenen Asparaginsäuren (D zu N) stark erniedrigt wird.

4. Diskussion

4.1 Wachstumstests

Die Wachstumstests auf Agarplatten mit limitierenden Kaliumkonzentrationen (10mM) erwiesen sich als guter Test, um Funktion von mutierten Tok1p-Kanälen schnell und einfach zu erfassen. Es zeigte sich, dass alle Kanalmutanten, die im Wachstumstest positiv waren, auch im elektrophysiologischen Experiment Funktion zeigten. Die Interpretation der beobachteten Wachstumsphänotypen ist allerdings recht schwierig.

Für Wildtyp Tok1p und für die D426N Mutante korreliert das Wachstum sehr gut mit den elektrischen Eigenschaften, wie sie in den Ganzzellaufleitungen beobachtet wurden. Die in den Wachstumstests (Abb.3.3) aufgetretene Hemmung der Stämme mit überexprimiertem Wildtypkanal Tok1p und der Mutante D426N durch Rubidiumionen konnte durch elektrophysiologische Experimente gestützt werden. So sind in den Deaktivierungsströmen des Tok1p-Kanals und des mutierten Kanals (D426N) bei Anwesenheit von 150mM Rubidium (ohne Kalium) in der Badlösung große Einwärtsströme während der Kanal-Deaktivierungsphase zu erkennen. Solche Einwärtsströme treten in Gegenwart von Natrium oder Cäsium im Medium nicht auf (Abb.3.3), auch nicht bei sehr negativen Membranspannungen (-100mV). Sowohl Tok1p Wildtyp, als auch die Mutante D426N sind demnach permeabel für Kalium und Rubidium, aber nicht für Natrium und Cäsium. Unter den experimentellen Bedingungen für die Wachstumsversuche mit millimolaren Calciumkonzentrationen im Medium ist Tok1p (oder die mutierten Tok1p-Kanäle) das einzige Transportsystem für die Kaliumaufnahme in Hefen ohne funktionale Trk-Transporter. Wie bereits beschrieben, ist in Anwesenheit von millimolaren Konzentrationen monovalenter Kationen im Außenmedium der unselektive Kationenkanal Nsc1p vollständig gehemmt (Bihler et al., 1998, Bihler et al., 2002). Somit muss ein direkter Zusammenhang zwischen Wachstumshemmung und Rubidiumaufnahme durch Tok1p und D426N postuliert werden. Allerdings ist nicht bekannt, dass Rubidium toxisch für Pflanzen und Pilze wäre, so dass die Hemmung auf eine reduzierte Kaliumaufnahme bzw. eine reduzierte intrazelluläre Kaliumkonzentration zurückzuführen ist. Natrium und Cäsium werden weder durch den Wildtypkanal Tok1p, noch durch den mutierten Kanal D426N transportiert. Entsprechend ist auch

nur geringe Wirkung von Natrium und Cäsium auf das Wachstum dieser Hefestämme zu beobachten.

Bei der Mutante Tok1p(D292N) kann das Wachstum auf Medien mit RbCl-Zusatz und die auftretende Wachstumshemmung bei Zusatz von NaCl nicht anhand der Deaktivierungsströme erklärt werden, da in dieser Mutante keine messbaren Einwärtsströme während der Deaktivierungsphase nachweisbar sind.

4.2 Die Rolle von N-Terminus und C-Terminus bei der Kanalassemblierung.

Der Mechanismus der Kanalassemblierung wird sowohl bei tierischen Kanälen als auch bei pflanzlichen Kanälen noch sehr kontrovers diskutiert. Bei tierischen Kanalproteinen wird der N-terminalen T1-Tetramerisierungsdomäne eine wichtige Funktion in der Kanalassemblierung zugesprochen, aber ihre Unabdingbarkeit ist noch nicht geklärt (Zerangue et al., 2000). Bei pflanzlichen Kanälen weisen einige Arbeiten darauf hin, dass dem C-Terminus eine wichtige Rolle bei der Kanalassemblierung zukommt (Dreyer et al., 2004, Daram et al., 1997). Im Fall des 2P-Kanals Twik1 spielt eine C-terminale Selbstassemblierungssequenz mit integriertem Cystein eine tragende Rolle in der Bildung funktionaler Kanaldimere (Lesage et al. 1996).

Im ORF von TOK1 ist weder eine Homologie zur T1-Tetramerisierungsdomäne der Shaker-Kanäle noch zur Dimerisierungsregion R57-V90 des Twik1-Kanals vorhanden. Um mögliche Dimerisierungsdomänen im Tok1p-Kanal zu identifizieren wurden sowohl N-terminale, als auch C-terminale Deletionsmutanten generiert und elektrophysiologisch untersucht.

Wie die Wachstumsversuche (Abb.3.2) und die elektrophysiologischen Messungen der $\Delta N(162\text{Start})$ -Mutante (Abb.3.26) zeigen, ist diese Mutante auch nach Deletion des gesamten N-Terminus noch in der Lage, voll funktionsfähige Kanäle zu bilden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der N-Terminus nicht maßgeblich zur Kanalassemblierung beiträgt, da ansonsten die vollständige Entfernung des N-Terminus zum Funktionsverlust, oder zumindest zu einer Beeinträchtigung der Kanalfunktion geführt hätte. In den elektrophysiologischen Messungen zeigt die

Mutante $\Delta N(I62Start)$ jedoch keinerlei Abweichungen von der Kanalcharakteristik des Tok1p.

Der Mutante $\Delta C(K470Stop)$ fehlt der gesamte C-Terminus und dennoch ist sie in der Lage funktionale Kaliumkanäle zu bilden. Somit weist auch bei der C-terminalen Deletionsmutante $\Delta C(K470Stop)$ alles darauf hin, dass der C-Terminus nicht maßgeblich zur Kanalassemblierung beiträgt. Im Gegensatz zur Mutante $\Delta N(I62Start)$ führt die Deletion des C-Terminus aber zu starken Veränderungen in der Kanalkinetik.

Damit ergaben die elektrophysiologischen Messungen der N-terminalen- und C-terminalen Deletionsmutanten keinen direkten Hinweis auf mögliche Dimerisierungsdomänen in diesen Bereichen des Kanalproteins Tok1p. Die Möglichkeit, dass Dimerisierungsdomänen in den N-terminalen oder C-terminalen Bereichen vorliegen, kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. In tierischen Systemen konnte gezeigt werden, dass die Deletion der T1-Domäne des ShB-Kanals die Effizienz der Assemblierung beeinträchtigt. Diese Beeinträchtigung in der Kanalassemblierung kann jedoch durch eine erhöhte Expression der Kanaluntereinheiten zum Teil aufgehoben werden (Zerangue et al., 2000).

Deshalb sollte man bei der Beurteilung, in wie weit der N-Terminus oder der C-Terminus des Tok1p-Kanals zur Assemblierung beitragen, die Möglichkeit nicht außer Acht lassen, dass durch den hohen Expressionslevel der Tok1p-Kanaluntereinheiten ein Einfluss des N-Terminus oder C-Terminus auf die Kanalassemblierung überdeckt wird.

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die Deletion der T1-Domäne des ShB-Kanals zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu negativeren Spannungen führt und dass die Inaktivierung des mutierten Kanals nicht mehr vollständig verläuft (Zerangue 2000).

4.3 Bedeutung des C-Terminus für die Spannungsabhängigkeit und die Deaktivierungskinetik von Tok1p

Der C-Terminus im Tok1p-Kanal macht fast 1/3 des gesamten Kanalproteins aus. Dies legt die Vermutung nahe, dass dem C-Terminus funktionale Aufgaben zukommen. Die Ergebnisse der durchgeführten elektrophysiologischen Experimente

weisen darauf hin, dass dem C-Terminus die Funktion einer Art Spannungssensors zukommt. C-terminale Deletionen führten zum Verlust der Spannungsabhängigkeit in der Kanalaktivierung. Gleichzeitig war mit zunehmender Deletion des C-Terminus eine Verschiebung der Strom-Spannungskurve zu positiveren Spannungen und eine veränderte Deaktivierungskinetik zu beobachten.

Eine Simulation der Deaktivierungsströme mit dem kinetischen 3-Zustandsmodell zeigt, dass eine Erhöhung der Übergangsrate (k_{oc}), mit der die Kanäle vom offenen in den geschlossenen Zustand übergehen dieselbe veränderte Deaktivierungskinetik hervorruft, wie sie in den gemessenen Deaktivierungsströmen der C-terminalen Deletionsmutante aufgetreten ist. Die Aktivierung (Anstieg des Stroms) blieb durch die Veränderung von k_{oc} jedoch weitgehend unverändert. Diese Beschleunigung des Übergangs vom offenen in den geschlossenen Zustand führt dazu, dass der Pool an offenen Kanälen abnimmt, da weniger Kanäle aus dem inaktiven Zustand nachgeliefert werden. Diese Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit durch Deletion des C-Terminus ist bei der Mutante $\Delta C(K470Stop)$ in der Deaktivierungskinetik zu erkennen.

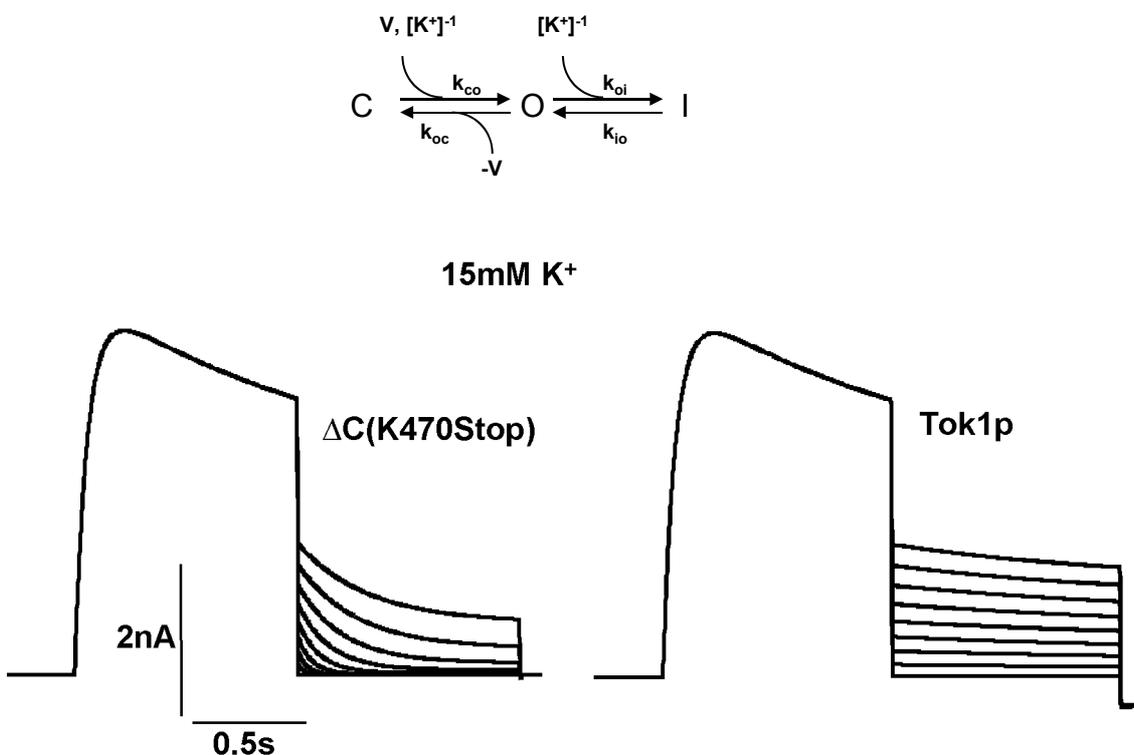


Abbildung 4.1 Mit dem 3-Zustandsmodell (oben) simulierte Deaktivierungsströme der C-terminalen Deletionsmutante $\Delta C(K470Stop)$ und des Wildtypkanals Tok1p bei 15mM KCl in der Perfusionslösung (unten). Die veränderte Deaktivierungskinetik der Mutante $\Delta C(K470Stop)$ ist auf eine Erhöhung der Übergangsrate (k_{oc}) vom offenen in den geschlossenen Zustand des Kanals zurückzuführen.

Eine mögliche mechanistische Erklärung dieser Beobachtungen könnte durch Arbeiten von Loukin et al. (2002) geliefert werden. Diese gehen davon aus, dass der C-Terminus von der cytoplasmatischen Seite in die Pore eindringt und eine schnelle Deaktivierung des Kanals wie ein „Fuß in der Tür“ verhindert. Anhand elektrophysiologischer Messungen an C-terminalen–Deletionsmutanten des Tok1p-Kanals konnten sie eine Verschiebung der Stromspannungs-Kurve zu positiveren Spannungen feststellen. Durch Koexpression des deletierten C-Terminus konnte die Verschiebung der IV-Kurve wieder rückgängig gemacht werden. Die Funktion des C-Terminus konnte weder durch DTT in der Perfusionslösung, noch durch 10 minütige Perfusion mit KCl-Lösung aufgehoben werden (Loukin et al., 2002). Dies spricht für eine starke Interaktion zwischen dem C-Terminus und dem Kern-Kanalprotein, jedoch gegen eine Interaktion über Disulfidbrücken.

Angenommen der C-Terminus dringt wirklich von der cytoplasmatischen Seite her in die Kanalpore ein, so könnte man sich folgendes Modell für die Funktion des C-Terminus vorstellen.

Die Anhäufung negativer Ladungen (D, E) im direkten Anschluss an Transmembrandomäne 8 führt zu einer Akkumulation von Kalium am inneren Porenhof. Diese Kaliumakkumulation fällt bei der C-terminalen Deletionsmutante $\Delta C(K470Stop)$ weg, die lokale intrazelluläre Kaliumkonzentration wird erniedrigt und es kommt zu einer Verschiebung der Stromspannungskurve zu positiveren Spannungen. Es ist bekannt, dass sich die Strom-Spannungskurve von Tok1p mit Veränderungen der intra- und extrazellulären Kaliumkonzentration entlang der Spannungsachse verschiebt (Bertl et al., 1992, Loukin und Saimi, 1999). Weiterhin wäre vorstellbar, dass die positiv geladenen Arginin-, Histidin und Lysinseitenketten im Bereich 582-674 als „gating charges“ fungieren und einen Teil des Spannungssensors darstellen.

Diese eventuell als Spannungssensor fungierende Domäne 582-674 könnte dann von der cytoplasmatischen Seite in die Pore eindringen und so die Deaktivierung modulieren, oder aber ähnlich wie im postulierten Paddel-Modell für den bakteriellen KvAP-Kanal aus *Aeropyrum pernix* (Jiang et al., 2003) durch Bewegung im elektrischen Feld Öffnung und Schließung des Kanals modulieren.

Die Annahme, dass die „Spannungssensor-Domäne 582-674“ in den inneren Porenbereich eindringt wäre konsistent mit dem von Loukin et al. (2002) postulierten

„Fuß in der Tür- Modell“ des C-Terminus. Die Interaktion des C-Terminus mit dem cytoplasmatischen Eingang zur Pore soll demnach das Schließen des Kanals bei negativen Spannungen verhindern oder verlangsamen.

Allerdings kann ein Mechanismus analog zum Paddel-Modell (Jiang et al., 2003) nicht ausgeschlossen werden. Schon eine sehr große cytoplasmatische Domäne wie der C-Terminus von Tok1p würde ein enormes Trägheitsmoment darstellen und durch direkte Kopplung an das cytoplasmatische Tor (gate) das beobachtete langsame Öffnen und Schließen des Kanals verursachen.

Ob man sich die strukturellen Einzelheiten und den Mechanismus wie oben beschrieben vorstellen kann, und welches der beiden Modelle eher zutrifft, ist anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse nur spekulativ und deshalb auch nur als mögliches Modell zu betrachten.

4.4 Die Anordnung der beiden Porenloops GLGD vor GYGD ist für das Gating von Tok1p wichtig.

In der Kaliumkanal-Signatursequenz der 1P-Kanäle findet man nur sehr selten Abweichungen vom charakteristischen GYGD-Motiv. Eine seltene Ausnahme bildet der humane *ether-a-go-go*-related-Kanal (Herg), der anstelle von GYGD ein GFGN-Motiv im Selektivitätsfilter enthält.

Bei 2P-Kanälen sind solche Abweichungen in der Kaliumkanal-Signatursequenz häufiger, wie zum Beispiel beim Tok1p-Kanal in Hefe oder beim menschlichen Twik1p-Kanal, sowie bei 2P-Kanälen in *C. elegans*. Im Hefekanal Tok1p ist im ersten Porenloop anstelle des Tyrosins ein Leucin eingebaut.

Wie in den Wachstumsexperimenten (Abb. 3.3) gezeigt, hat weder der Austausch der Aminosäure Leucin gegen Tyrosin im ersten Porenloop, noch der Austausch von Tyrosin gegen Leucin im zweiten Porenloop einen Verlust der Kanalfunktion zur Folge. Dies zeigt, dass Tok1p-Kanaluntereinheiten auch mit vier Tyrosinen (Mutante L290Y) beziehungsweise vier Leucinen (Mutante Y424L) im Selektivitätsfilter funktionale Kanäle bilden können. Ebenso ist ein Tok1p-Kanal mit reverser Anordnung der Signatursequenzen, also GYGD vor GLGD wie bei Mutante L290Y/Y424L, im homologen System Hefe funktional.

Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Lesage et al. (1996), die in Patch-Clamp-Experimenten festgestellt haben, dass die drei Mutationen L290Y, Y424L und L290Y/Y424L im Tok1p-Kanal zu nichtfunktionalen Kanalproteinen führen. Diese elektrophysiologischen Untersuchungen der Tok1p-Mutanten wurden allerdings im heterologen Expressionssystem *Xenopus* durchgeführt.

Im homologen Expressionssystem Hefe konnte die Funktionalität dieser mutierten Tok1p-Kanalproteine auch durch elektrophysiologische Ganzzellaufbauten eindeutig belegt werden (Abb. 3.28).

Können die Abweichungen der beiden Mutanten L290Y und L290Y/Y424L von der charakteristischen Kinetik des Wildtypkanals Tok1p durch Interaktionen der Tyrosinseitenketten mit benachbarten Aminosäuren erklärt werden?

Chapman et al. (2001) haben untersucht, in wie weit die häufig auftretenden Sequenzvariationen in der Signatursequenz GYGD der 2P-Kanäle die Ionenselektivität und die Permeation beeinflussen. Dazu wurden Tandemkonstrukte des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv2.1 konstruiert, um das GYGX-GXGD-Motiv von 2P-Kanälen zu imitieren und die Interaktionen zwischen Tyrosin und Asparaginsäure benachbarter Untereinheiten zu untersuchen. Demnach soll eine Interaktion zwischen dem Tyrosin (Y) des GYGD-Motivs der ersten Untereinheit und der Asparaginsäure (D) der benachbarten Untereinheit existieren. Diese Interaktion zwischen den beiden Untereinheiten über Y und D soll die Ionenselektivität, das Gating und die Leitfähigkeit der 2P-Kanäle bestimmen.

Die Stromspuren von Mutante Tok1p(L290Y) zeigen, dass bei dem mutierten Tok1p-Kanalprotein mit vier Tyrosinen im Selektivitätsfilter die Kanalaktivierung viel schneller verläuft als beim Wildtypkanal Tok1p (Abb.3.28). Deshalb ist anzunehmen, dass das Leucin an Position 290 des ersten Porenloops für die charakteristische Aktivierungskinetik von Tok1p notwendig ist. Auch die Stromspuren der Tok1p(L290Y/Y424L) Mutante zeigen eine viel schnellere Aktivierung und zusätzlich einen geringeren Gleichgewichtsstrom als der Wildtypkanal. Da bei dieser Mutante nur die Reihenfolge der Anordnung in den Signaturmotiven von GLGD-GYGD zu GYGD-GLGD geändert wurde, wären hier die gleichen Interaktionen zwischen D und Y wie beim Wildtypkanal möglich. Die Aktivierungskinetik der (L290Y/Y424L) Mutante

weicht jedoch stark vom Wildtypkanal ab, so dass im Falle vom Tok1p-Kanal nicht ausschließlich die Interaktionen zwischen D und Y zweier benachbarter Kanaluntereinheiten zur veränderten Kinetik beitragen können. Um die veränderte Aktivierungskinetik der LYYL-Mutante erklären zu können, müssen wohl eher Interaktionen zwischen den Leucinseitenketten, beziehungsweise den Tyrosinseitenketten mit anderen benachbarten Aminosäuren in Betracht gezogen werden.

Ohne Kenntnisse der zugrundeliegenden strukturellen Voraussetzungen im Selektivitätsfilter des Tok1p-Kanals und der daraus resultierenden möglichen Interaktionen kann zum jetzigen Zeitpunkt allerdings keine nähere Aussage getroffen werden, warum der Austausch von Leucin zu Tyrosin im ersten Porenloop zu einer schnelleren Kanalaktivierung führt.

4.5 Der externe Ring negativ geladener Aspartatseitenketten moduliert Gating und Permeation von Tok1p.

Die elektrophysiologischen Ganzzellaufzeichnungen der beiden D \square N-Mutanten zeigen deutlich, dass Mutationen im negativ geladenen Ring der Asparaginsäureseitenketten zu starken Veränderungen in der Kinetik von Tok1p führen.

Am auffälligsten waren die Ergebnisse der Analyse des Peak-Stroms in Abhängigkeit von der externen Kaliumkonzentration (Abb.3.18).

Bei komplett vorhandenem Ring negativ geladener Aspartatseitenketten (Wildtyp und D292E-Mutante) waren die Kaliumauswärtsströme umgekehrt proportional zur externen Kaliumkonzentration. Nach Entfernung von zwei Asparaginsäuren an der äußeren Porenöffnung (D292N und D426N-Mutanten) waren die Kaliumauswärtsströme jedoch direkt proportional zur extrazellulären Kaliumkonzentration (Abb. 3.18).

Die umgekehrt proportionale Abhängigkeit der Auswärtsströme beim Wildtypkanal und der D292E-Mutante (größere Ströme bei geringerer externer Kaliumkonzentration) kann folgendermaßen erklärt werden.

Eine Erhöhung der externen Kaliumkonzentration resultiert, durch Erniedrigung des nach außen gerichteten Konzentrationsgradienten, in einer Abnahme der Triebkraft

für den Kaliumexport und somit auch in geringeren Strömen. Zusätzlich war sowohl beim Wildtypkanal Tok1p, als auch bei der D292E-Mutante eine deutliche Kaliumabhängigkeit der Aktivierungszeiten zu beobachten. Die Aktivierungszeiten zeigten in beiden Fällen eine lineare Kaliumabhängigkeit mit verlangsamter Aktivierung, bei Erhöhung der externen Kaliumkonzentration. Dies erniedrigt zusätzlich die Offenwahrscheinlichkeit bei höherer externer Kaliumkonzentration, was ebenfalls zu einer Abnahme des Auswärtsstroms führen würde.

Anders verhält sich die Sache bei den beiden Mutanten D292N und D426N. Zwar wird auch hier die Triebkraft für den Kaliumexport durch Erhöhung der externen Kaliumkonzentration verringert, dennoch war eine Erhöhung der Auswärtsströme zu beobachten. Diese Erhöhung der Auswärtsströme muss demnach ihren Grund in einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit oder in einem Anstieg der Zahl aktivierbarer Kanäle haben. Die Zeitkonstanten für die Aktivierung zeigten nur eine sehr geringe Abhängigkeit von der externen Kaliumkonzentration, während die Inaktivierung mit steigender Kaliumkonzentration langsamer wurde. Dies hätte eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit und somit einen Anstieg des Auswärtsstromes zur Folge. Die kaliumabhängige schnelle Inaktivierung würde darauf hindeuten, dass eine große Anzahl an Kanalproteinen bei geringen externen Kaliumkonzentrationen in einem inaktiven, nicht leitenden Zustand vorliegen. Ein solcher kaliumabhängiger nicht leitender Zustand könnte in Form eines Porenkollapses, wie er für den KcsA-Kanal beschrieben wurde, vorliegen (Zhou, 2001; MacKinnon 2003).

Wenn man die Informationen über die strukturellen Änderungen in der Filterregion des KcsA-Kanals bei niedrigen externen Kaliumkonzentrationen auf den Tok1p-Kanal überträgt, könnte man folgendes Modell postulieren.

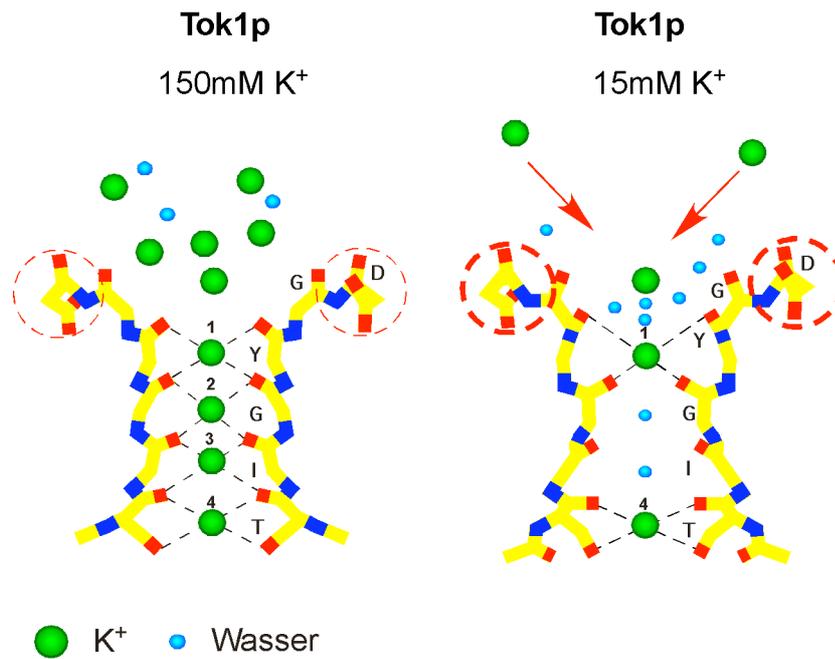


Abbildung 4.2 „Kaliumabhängiges Filter-Stabilisierungs-Modell“ für Tok1p. Selektivitätsfilter des Tok1p-Kanals bei 150mM und 15mM externem Kalium: gelb dargestellt ist das Peptidgrundgerüst in der Filterregion. Zur besseren Übersicht sind nur die beiden zur Filterregion beitragenden 2.Porenloops (GYGD) der Tok1p-Dimere zu sehen. Rot hervorgehoben sind die für die K⁺-Koordinierung wichtigen Carbonyl-Sauerstoffatome, bzw. die Seitenketten-Sauerstoffatome der Asparaginsäure (D) am äußeren Porenbereich und die Seitenketten-Sauerstoffatome des Treonins (T) am Ende des Selektivitätsfilters (alle anderen Seitenketten wurden zur besseren Übersichtlichkeit weggelassen). Blau hervorgehoben sind die Peptidbindungen im Proteingrundgerüst. Der Einfluß der negativ geladenen Aspartatseitenketten auf die Kaliumakkumulation ist durch einen rot-gestrichelten Kreis und rote Pfeile dargestellt. Die Zahlen 1-4 geben die Positionen der möglichen Kaliumbindestellen an. Weiteres siehe Text.

Bei 150mM Kalium im Außenmedium sind alle vier möglichen „Kalium-Bindestellen“ in der Filterregion des Tok1p-Kanals besetzt und der Kanal hat seine volle Leitfähigkeit. Entsprechend sind nach Aktivierung der Kanäle durch einen positiven Spannungssprung große Ströme und keine, oder nur eine schwache und langsame Inaktivierung zu beobachten.

Bei Absenkung der extrazellulären Kaliumkonzentration würde sich die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass es aufgrund fehlender Besetzung der äußersten Kaliumbindestelle (1) zu einer Konformationsänderung in der Filterstruktur des Kanals kommt und die Pore daraufhin kollabiert. Die negativen Aspartatseitenketten tragen jedoch zu einer Erhöhung der lokalen Kaliumkonzentration im äußeren Porenbereich bei, so dass trotz geringer Kaliumkonzentration im Medium die lokale

Kaliumkonzentration hoch genug ist, um die Struktur der Pore zu stabilisieren. Wird nun eine positive Membranspannung angelegt, so sind relativ viele Kanäle aktivierbar (K^+ -Bindestelle 1 besetzt) und es ist ein großer Auswärtsstrom zu beobachten. Die positive Membranspannung wirkt nun der elektrostatischen Wirkung der negativen Seitenketten entgegen, die lokale extrazelluläre Kaliumkonzentration wird leicht erniedrigt und ein Teil der Poren kollabiert. Dies ist in der spontanen Inaktivierung der Auswärtsströme zu sehen. Die Dissoziation der Kaliumionen von der Kaliumbindestelle (1) bestimmt nun die Kinetik der Inaktivierung. Diese Dissoziation ist um so schneller, je geringer die lokale externe Kaliumkonzentration ist. Gleichzeitig wird das Gleichgewicht von Dissoziation/Bindung mit abnehmender Kaliumkonzentration in Richtung Dissoziation verschoben. Dies erklärt die schneller werdende und stärker ausgeprägte Inaktivierung mit sinkender externer Kaliumkonzentration.

Bei den Mutanten D292N (und D426N) ist die Anzahl der negativen Ladungen durch die Carboxylgruppen der Asparaginsäuren reduziert, weshalb die lokale, elektrostatische Akkumulation von Kalium im äußeren Porenbereich weit geringer ist als beim Wildtypkanal Tok1p. Dies hat zur Folge, dass die Inaktivierung bei der D292N-Mutante bei 150mM externem Kalium und einer Membranspannung von +100mV etwa 15 mal so schnell ist wie die Inaktivierung des Wildtypkanals Tok1p unter vergleichbaren Bedingungen. Ein weiteres Absenken der externen Kaliumkonzentration beschleunigt die Inaktivierung, so dass die Aktivierung der Kanäle durch die schnelle Inaktivierung immer stärker überlagert wird und die Stromamplitude, wie in Abbildung 3.12 zu sehen ist, trotz erhöhter Triebkraft abnimmt.

In diesem Grenzbereich zeigt sich auch eine Abhängigkeit der Peak-Ströme von der angelegten Haltespannung. Durch Anlegen einer negativen Haltespannung an die Membran, kann die lokale Kaliumkonzentration auch an der äußeren Porenregion des mutierten Kanalproteins D292N erhöht werden und damit die Anzahl der Kanäle, die sich im aktivierbaren Zustand befinden (Abb.3.12).

Mit dem oben beschriebenen Modell, das auch in dem kinetischen 3-Zustandsmodell wiedergegeben ist, kann somit sowohl die Abhängigkeit des Peak-Stroms von der externen Kaliumkonzentration (Abb.3.17), als auch die Abhängigkeit von der

angelegten Haltespannung (Abb.3.13) der D292N-Mutante recht gut beschrieben werden.

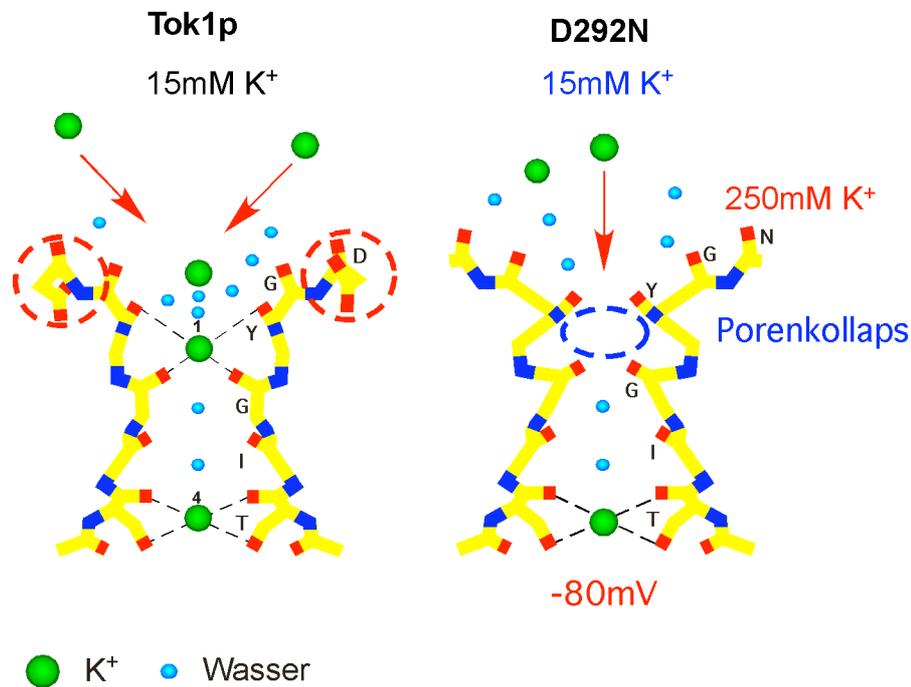


Abbildung 4.3. „Kaliumabhängiges Filter-Stabilisierungs-Modell“ für D292N. Selektivitätsfilter des Tok1p und des mutierten Tok1p(D292N)-Kanals bei 150mM und 15mM externem Kalium: gelb dargestellt ist das Peptidgrundgerüst in der Filterregion. Zur besseren Übersicht sind nur die beiden zur Filterregion beitragenden 2.Porenloops (GYGD) der Tok1p-Dimere zu sehen. Rot hervorgehoben sind die für die K⁺-Koordinierung wichtigen Carbonyl-Sauerstoffatome, bzw. die Seitenketten-Sauerstoffatome der Asparaginsäure (D) am äußeren Porenbereich und die Seitenketten-Sauerstoffatome des Treonins (T) am Ende des Selektivitätsfilters (alle anderen Seitenketten wurden zur besseren Übersichtlichkeit weggelassen). Blau hervorgehoben sind die Peptidbindungen im Proteingrundgerüst. Der Einfluß der negativ geladenen Aspartatseitenketten (Tok1p) bzw. der höheren extrazellulären Kaliumkonzentration und der Haltespannung von -80mV (D292N) auf die Kaliumakkumulation ist durch rote Pfeile dargestellt. Der blau gestrichelte Kreis symbolisiert den auftretenden Porenkollaps an Position 1 des Filters. Die Zahlen 1+4 geben die Positionen der möglichen Kaliumbindestellen an. Weiteres siehe Text.

Unsere Beobachtungen, dass der Ring negativ geladener Asparaginsäuren die Kaliumleitfähigkeit und das Gating des Tok1p-Kanals moduliert steht im Einklang mit den von Haug et al. (2004) veröffentlichten Daten. Haug et al. stellten fest, dass der negativ geladenen Asparaginsäure an Position 292 in der α -Untereinheit des menschlichen hSlo-Kanals eine wichtige Rolle bei der Kaliumleitfähigkeit, der Kanalöffnung und dem Ladungstransport zukommt. Die reduzierte Kanalleitfähigkeit der Mutante hSlo(D292N) führen sie darauf zurück, dass die negativ geladenen

Aspartatseitenketten D292 mit zur Kanalleitfähigkeit beitragen, indem sie die Kaliumakkumulation im äußeren Porenbereich fördern.

Ein weiteres Beispiel um den starken Einfluss negativ geladener Aspartatseitenketten am äußeren Porenrand eines Kanals aufzuzeigen ist der humane *ether-a-go-go*-related-Kanal (Herg). Bei heterologer Expression des Herg-Kanals in *Xenopus*-Oozyten zeigt er auf eine Depolarisation hin Auswärtsströme. Diese Auswärtsströme weisen eine sehr schnelle Inaktivierung auf, die nicht auf eine N-Typ-Inaktivierung zurückgeht, da eine Deletion des N-Terminus keine Auswirkungen auf die Inaktivierung hat (Spector et al., 1996). Untersuchungen von Smith et al. (1996) zeigten, dass die Inaktivierung des Herg-Kanals eher der von Shaker-Kanälen bekannten C-Typ-Inaktivierung entspricht, jedoch sehr viel schneller verläuft.

Lees-Miller et al. (1999) konnten zeigen, dass die Mutation N629D im Signaturmotiv GFGN des Herg-Kanals zu sehr schnell aktivierenden jedoch nicht mehr inaktivierenden Kanalproteinen führt. Damit konnte gezeigt werden, dass durch Einführen von vier negativen Aspartatseitenketten am äußeren Porenbereich aus einem schnell inaktivierenden Herg-Kanal (4N) ein nicht mehr inaktivierender Herg-Kanal (4D) gemacht werden kann.

Ohne konkrete Strukturdaten des funktionalen Tok1p-Kanals können die erhaltenen Ergebnisse nur basierend auf den Strukturdaten des KcsA-Kanals diskutiert werden. Anhand der bisherigen Daten ist es nicht möglich eine endgültige Aussage darüber zu treffen, ob der negative Oberflächen-Ladungs-Effekt der Asparaginsäuren und die daraus resultierende Kaliumakkumulation in allen Einzelheiten durch das KcsA-Strukturmodell erklärbar sind. Dazu sind Strukturdaten des Tok1p-Kanals unerlässlich.

Schon in den durchgeführten Wachstumsexperimenten waren starke Unterschiede im Wachstumsverhalten der beiden D□ N-Mutanten erkennbar. Dies war ein erster Hinweis, dass die beiden Asparaginsäuren D292 und D426 im Kanalprotein Tok1p unterschiedlich zur Kanalfunktion beitragen (Abb.3.4, Abb.3.5).

Auch in den elektrophysiologischen Ganzzellaufzeichnungen der beiden D \square N-Mutanten fiel auf, dass der Austausch der Asparaginsäure an Position 292 im ersten Porenloop zu einer viel stärkeren Inaktivierung in den Gleichgewichtsströmen führt als bei der Mutante D426N im zweiten Porenloop.

Diese Abweichungen in der Inaktivierung lassen sich durch das „Kaliumabhängige-Filter-Stabilisierungs-Modell“ des KcsA-Kanals nicht ohne weiteres erklären. Auch die Tatsache, dass bei der Mutante D292N sowohl die Spannungsabhängigkeit, als auch die Kaliumabhängigkeit der Aktivierungszeitkonstante stark reduziert wird, während es bei der Mutante D426N nur zur Reduktion der Kaliumabhängigkeit kommt, ist mit dem KcsA-Modell nicht zu erklären. Sicher ist jedoch, dass sich die in dieser Arbeit durchgeführte D \square N-Mutation im ersten Porenloop (D292N) stärker auf die Kanalfunktion auswirkte als die D \square N-Mutation (D426N) im zweiten Porenloop.

Auch bei den L \square Y-Mutanten führte eine Mutation im Selektivitätsfilter der ersten Porenregion zu stärkeren Auswirkungen auf die Kanalfunktion. Der Austausch des Leucins im GLGD-Motiv des ersten Porenloops gegen ein Tyrosin führte zu einer schnelleren Aktivierung des Tok1p-Kanals, während der Austausch des Tyrosins im GYGD-Motiv des zweiten Porenloops zu Leucin, keine Auswirkungen auf das Kanalprotein Tok1p zeigte (Abb.3.28). Diese Ergebnisse deuten auf einen unterschiedlichen Beitrag der beiden Porenloops zur Bildung der Pore hin. Um diesen unterschiedlichen Beitrag der Porenloops an der Porenbildung veranschaulichen zu können, ist es hilfreich sich die mögliche Struktur des Tok1p-Kanaldimers anzuschauen. Da dieses Strukturmodell jedoch mit Hilfe des Programms EsyPred3D (Lambert, C., 2002) basierend auf den Strukturdaten des KcsA-Kanals erstellt wurde, ist es nur als eine erste Näherung für die Tok1p-Struktur zu sehen.

Schon aufgrund der Abweichungen in der Aminosäurestruktur muss man beim Tok1p-Kanal eher von einer zweifachen Symmetrie in der Filterregion ausgehen als von einer vierfachen, wie sie in der Filterregion des KcsA-Kanals vorliegt (Abb.4.3).

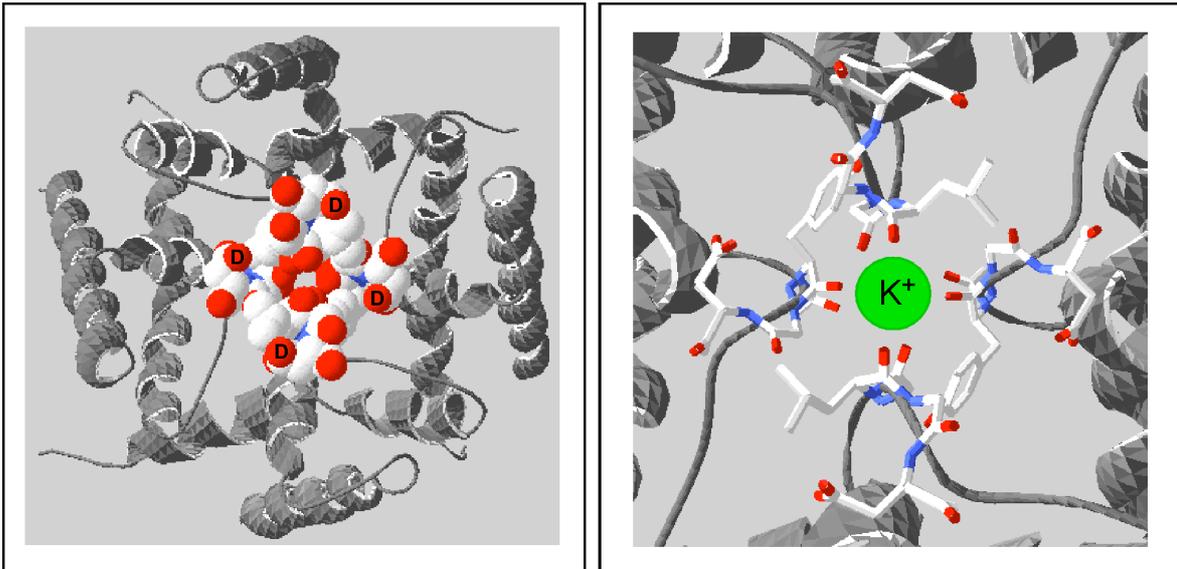


Abbildung 4.3 Aufsicht auf ein mögliches Strukturmodell von Tok1p. Dargestellt sind die Transmembrandomänen TM5-TM8 der beiden kanalbildenden Untereinheiten von Tok1p. Die Carbonyl-Sauerstoffatome des Peptidgrundgerüsts, die Carboxyl-Sauerstoffatome der Aspartatseitenkette (D) und das Sauerstoffatom der Tyrosinseitenkette sind rot hervorgehoben. Erkennbar ist eine zweifache Symmetrie (Achse von rechts oben nach links unten) des Tok1p-Kanalproteins.

Aufgrund der erhaltenen elektrophysiologischen Daten für die L \square Y-Mutanten und für die D \square N-Mutanten ist es durchaus vorstellbar, dass die zweifache Symmetrie in der Tok1p Filterregion für die Aufrechterhaltung der Filterstruktur ideal ist. Die Abweichung vom GYGD-Motiv im 1. Porenloop (L anstelle von Y) könnte im Tok1p-Kanal somit die Voraussetzung für die Bildung eines stabilen Offenzustands des Kanals darstellen. Diese Annahme kann durch die These von Chapman et al. (2001) gestützt werden, dass das Muster der Sequenzvariationen in den Signaturmotiven GYGX-GXGD der 2P-Kanäle von physiologischer Signifikanz ist.

4.6 Die Messungen der D \square N-Mutanten lassen sich durch ein kinetisches 3-Zustandsmodell beschreiben

Die Eigenschaften von Tok1p und einiger Mutanten konnten mit einem seriellen 3-Zustandsmodell gut beschrieben werden. Das Modell sieht zwei nicht leitende (c und i) und einen zentralen leitenden Zustand (o) vor, wobei die Übergänge k_{co} und k_{oc} spannungsabhängig und die Übergänge k_{co} und k_{oi} kaliumabhängig sind. Die kaliumabhängigen Übergänge sind dabei umgekehrt proportional zur extrazellulären Kaliumkonzentration. Die Beobachtung, dass die Aktivierung von Tok1p mit positiver

werdender Membranspannung und die Deaktivierung mit negativer werdender Membranspannung schneller wird, führt zur Einführung der Spannungsabhängigkeit bei k_{co} und k_{oc} . Neben der Spannungsabhängigkeit zeigte sich eine Abhängigkeit der gemessenen Auswärtsströme von der extrazellulären Kaliumkonzentration. Erniedrigung der externen Kaliumkonzentration führte zu einem schnelleren Anstieg des Stromes und zu einer Erhöhung der Stromamplitude (sowohl des Peak-Stroms als auch des Gleichgewichtsstroms). Einhergehend mit der schnelleren Aktivierung war eine auftretende Inaktivierung. Die Inaktivierung erfordert die Einführung eines dritten Zustandes (i) mit den Übergängen k_{oi} und k_{io} , wobei k_{oi} von der externen Kaliumkonzentration abhängt. Da mit geringer werdender externer Kaliumkonzentration die Inaktivierung ausgeprägter und schneller wird, muss die Kaliumabhängigkeit in k_{oi} mit $[K^+]^{-1}$ eingehen. Prinzipiell könnte das Auftreten der Inaktivierung mit Erniedrigung der externen Kaliumkonzentration auch die schneller werdende Aktivierung erklären, nicht jedoch den gleichzeitig zu beobachtenden Anstieg in der Stromamplitude. Dies erfordert die Einführung der Kaliumabhängigkeit mit $[K^+]^{-1}$ auch in k_{co} . Mit diesem seriellen 3-Zustandsmodell konnten nun sowohl die Eigenschaften von Tok1p, als auch der Mutanten D292N (und D426N) gut beschrieben werden.

Dies sind i) langsame Aktivierung und schwache Inaktivierung beim Wildtyp, schnelle Aktivierung, schnelle und fast vollständige Inaktivierung bei der D292N-Mutante, ii) umgekehrt proportionale Abhängigkeit der Stromamplitude von der externen Kaliumkonzentration im Wildtyp und direkt proportionale Abhängigkeit in der D292N-Mutante, iii) Abhängigkeit der Stromamplitude von der Haltespannung in der D292N-Mutante und fehlende Abhängigkeit von der Haltespannung im Wildtypkanal Tok1p.

5. Zusammenfassung

- Im spannungsabhängigen 2-P-Kaliumkanal Tok1p von Hefe ist weder der N-Terminus noch der C-Terminus maßgeblich an der Kanalassemblierung beteiligt. Dies konnte anhand elektrophysiologischer Ganzzellaufzeichnungen an N-terminalen- und C-terminalen Deletionsmutanten von Tok1p festgestellt werden.
- Die Deletion des C-Terminus führt zu einem Verlust der Spannungsabhängigkeit, zu einer Verschiebung der IV-Kurve und zu einer veränderten Deaktivierungskinetik. In dieser Arbeit durchgeführte elektrophysiologische Untersuchungen weisen auf eine Beteiligung des C-Terminus an der Spannungsregulation des Tok1p-Kanals hin.
- Die Anordnung der beiden Porenloops GLGD vor GYGD ist für das Kanal gating von Tok1p wichtig. Durch Mutation des Leucins bzw. Tyrosins im GLGD bzw. GYGD-Motiv des Selektivitätsfilters konnten funktionale Kanalproteine generiert werden.
- Der externe Ring negativ geladener Aspartatseitenketten moduliert Gating und Permeation von Tok1p. In den Ganzzellaufzeichnungen der D292N-Mutante war eine sehr schnelle, fast vollständige Inaktivierung der Kanalproteine zu erkennen. Diese Inaktivierung trat bei der Mutante D426N in abgeschwächter Form auf. Die Entfernung zweier negativ geladener Aspartatseitenketten führte bei der Mutation im 1. Porenloop zum Verlust der Kaliumabhängigkeit und der Spannungsabhängigkeit in der Aktivierung. Bei der D426N-Mutante im 2. Porenloop war nur ein Verlust der Kaliumabhängigkeit in der Aktivierung zu beobachten.
- Anhand der durchgeführten elektrophysiologischen Untersuchungen an den Aminosäure-Austauschmutanten lässt sich die Aussage treffen, dass eine Mutation im 1. Porenloop mit einer stärkeren Abweichung von der Charakteristik des Wildtypkanals verbunden war, als das bei Mutationen im 2. Porenloop der Fall war. Dies deutet darauf hin, dass die Aminosäuresequenz des GLGD-Motivs im 1. Porenloop die Voraussetzung für die Bildung eines stabilen Offenzustands des Tok1p-Kanals darstellt.
- Die Messungen des Wildtypkanals Tok1p und der D \square N-Mutanten lassen sich durch ein kinetisches 3-Zustandsmodell beschreiben, wobei die veränderte

Kinetik und Kaliumabhängigkeit durch veränderte lokale Kaliumkonzentrationen erklärt werden können.

6. Literatur

Anderson, J.A., Huprikar, S.S., Kochian, L.V. Lucas, W.J., Gaber, R.F. 1992. Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3736-3740

André, B. 1995. An Overview of Membrane Transport Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. YEAST 11:1575-1611

Ashcroft, F.M. 2000. Ion Channels and Disease. Academic Press. San Diego, California

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Editoren). 1999. Short Protocols In Molecular Biology. John Wiley & Sons. New York

Baukrowitz T., Yellen, G. 1996. Two functionally distinct subsites for the binding of internal blockers to the pore of voltage-activated K⁺ channels. PNAS 93:13357-13361

Becker, D., Dreyer, I., Hoth, S., Reid, J., Busch, H., Lehnen, M., Palme, K., Hedrich, R. 1996. Changes in voltage activation, Cs⁺ sensitivity, and ion permeability in H5 mutants of the plant K⁺ channel KAT1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8123-8128

Becker, D., Geiger, D., Dunkel, M., Roller, A., Bertl, A., Latz, A., Carpaneto, A., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G., Voelker, C., Schmidt, D., Mueller-Roeber, B., Czempinski, K., Hedrich, R. 2004. AtTPK4, an *Arabidopsis* tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner. PNAS 101:15621-15626

Bertl, A., Bihler, H., Kettner, C., Slayman, C.L. 1998(b). Electrophysiology in the eukaryotic model cell *Saccharomyces cerevisiae*. Pflügers Arch-Eur J Physiol 436:999-1013

Bertl, A., Bihler, H., Reid, J. D., Kettner, C., Slayman, C.L. 1998(a). Physiological Characterization of the Yeast Plasma Membrane Outward Rectifying K⁺ Channel, DUK1 (TOK1), In Situ. J. Membrane. Biol. 162:67-80

Bertl, A., Blumwald, E., Coronado, R., Eisenberg, R., Findlay, G., Gradmann, D., Hille, B., Köhler, K., Kolbe, H.-A., Mac-Robby, E., Meissner, G., Miller, C., Neher, E., Palade, P., Pantoja, O., Sanders, D., Schroeder, J., Slayman, C.L., Spanswick, R., Williams, A. 1992. Electrical measurements on endomembranes. Science 258:873-874

Bertl, A., Ramos, J., Ludwig, J., Lichtenberg-Frate, H., Reid, J., Bihler, H., Calero, F., Martinez, P., Ljungdahl, P. 2003. Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. Molecular Microbiology 47:767-780

- Bertl, A., Slayman, C.L., Gradmann, D. 1993.** Gating and Conductance in an Outward-Rectifying K⁺ Channel from the Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Membrane Biol.* 132:183-199
- Bezanilla, F., Prozo, E., Stefani, E. 1994.** Gating of Shaker K⁺ Channels: II. The Components of Gating Currents and a Model of Channel Activation. *Biophysical Journal* 66:1011-1021
- Bignell, G.R., Evans, I.H.** Genomic Yeast DNA Clone Banks. From: *Methods in Molecular Biology*, Vol.53: Yeast Protocols Edited by: Evans Humana Press Inc. Totowa, NJ. 1996.
- Bihler, H., Slayman, C.S., Bertl, A. 1998.** NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 432:59-64
- Bonetti, B., Fu, L., Bedwell, D.M. 1995.** The efficiency of translation termination is determined by a synergistic interplay between upstream and downstream sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 251(3):334-345
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. 2000.** *Biochemistry & Molecular Biology of the Plants*. American Society of Plant Physiologists Rockville, Maryland
- Chapman, M.L., Krovetz, H.S., VanDongen, A. 2001.** GYGD pore motifs in neighbouring potassium channel subunits interact to determine ion selectivity. *Journal of Physiology* 530:21-33
- Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T., Müller-Röber, B. 1996.** Cloning and functional expression of plant outward rectifying K channels. *Proc. SEB Plant Transp. Wkshp*, Saltash, Cornwall, UK, Sept. 1996
- Daram, P., Urbach, S., Gaymard, F., Sentenac, H., Chérel, I. 1997.** Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. *The EMBO Journal* 16:3455-3463
- Dörk, T., Stuhmann, M. 1996.** *Molekularbiologie der Mukoviszidose*. *Biologie in unserer Zeit* 5:282-291
- Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, A.K., 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
- Dreyer, I., Becker, D., Bregante, M., Gambale, F., Lehnen, M., Palme, K., Hedrich, R. 1998.** Single mutations strongly alter the K⁺-selective pore of the K_{in} channel KAT1. *FEBS Letters* 430:370-376
- Dreyer, I., Porée F., Schneider, A., Mittelstädt, J., Bertl, A., Sentenac, H., Thibaud, J., Mueller-Roeber, B. 2004.** Assembly of Plant Shaker-Like K_{out} Channels Requires Two Distinct Sites of the Channel α -Subunit. *Biophysical Journal* 87:858-872

Eghbali, M., Olcese, R., Zarei, M.M., Toro, L., Stefani, E. 2002. External Pore Collapse as an Inactivation Mechanism for Kv4.3 K⁺ Channels. *J. Membrane Biol.* 188:73-86

Elinder, F., Männikkö, R., Larsson, H.P. 2001. S4 Charges Move Close to Residues in the Pore Domain during Aktivation in a K Channel. *J. Gen. Physiol.* 118:1-10

Fairman, C., Zhou, X.-L., Kung, C. 1999. Potassium Uptake Through the TOK1 K⁺ Channel in the Budding Yeast. *J. Membrane Biol.* 168:149-157

Goldstein, S.A.N., Price, L.A., Rosenthal, D.N., Pausch, N.H. 1996. ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13256-13261

Gustin, M.C., Martinac, B., Saimi, Y., Culbertson, M.R., Kung, C. 1986. Ion channels in yeast. *Science* 233:1195-1197

Haug, T., Olcese, R., Ligia, T., Stefani, E. 2004. Regulation of K⁺ Flow by a Ring of Negative Charges in Outer Pore of BK_{Ca} Channels. Part2: Neutraization of aspartate 292 reduces long channel openings and gating current slow component. *J. Gen. Physiol.* 124:185-197

Haug, T., Sigg, D., Ciani, S., Toro, L., Stefani, E., Olcese, R. 2004. Regulation of K⁺ Flow by a Ring of Negative Charges in Outer Pore of BK_{Ca} Channels. Part1: Aspartate 292 modulates K⁺ Conduction by External Surface Charge Effect. *J. Gen. Physiol.* 124:173-184

Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., MacKinnon, R. 1994. Mutations in the K⁺ channel signature sequenz. *Biophys. J.* 66:1061-1067.

Heginbotham, L., MacKinnon, R. 1992. The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron* 8:483-491

Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J., Tzagoloff, A. 1986. Yeast /E.coli Shuttle Vectors with Multiple Unique Restriction Sites. *YEAST* 2:163-167

Hille, B., Schwarz, W. 1979. K channels in excitable cells as multi-ion pores. *Brain Res Bull.* 4:159-162

Ho, K., Nichols, C.G., Lederer, W.J., Lytton, J., Vassilev, P.M., Kanazirska, M.V., Hebert, S.C. 1993. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362:31-38

Horvath, A., Riezman, H. 1994. Rapid protein extraction from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10(10):1305-1310

Hoshi, T., Zagotta, W.N., Aldrich, R.W. 1990. Biophysical and molecular mechanisms of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science* 250:533-538

Hoshi, T., Zagotta, W.N., Aldrich, R.W. 1991. Two types of inactivation in *Shaker* K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* 7:547-556

Hoth, S., Geiger, D., Becker, D., Hedrich, R. 2001. The Pore of Plant K⁺ Channels is Involved in Voltage and pH Sensing: Domain-Swapping between Different K⁺ Channel α -Subunits. *The Plant Cell*. 13:943-952

Jan, L.Y., Jan, Y.N. 1997. Cloned Potassium Channels From Eukaryotes and Prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.* 20:91-123

Jiang, Y.X., Ruta, V., Chen, J.Y., Lee, A., MacKinnon, R. 2003. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423:42-48

Kasolapov A., Deutsch, C. 2003. Folding of the Voltage-gated K⁺ Channel T1 Recognition Domain. *The Journal of Biological Chemistry* 278:4305-4313

Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., Goldstein, S.A.N. 1995. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376:690-695

Kirsch, G., Pascual, J., Shieh, C. 1995. Functional Role of a Conserved Aspartate in the External Mouth of Voltage-Gated Potassium Channels. *Biophysical Journal* 68:1804-1813

Kiss, L., Turco, J., Korn, S. 1999. Contribution of the Selectivity Filter to Inactivation in Potassium Channels. *Biophysical Journal* 76:253-263

Kubo, Y., Baldwin, T.J., Jan, Y.N., Jan, L.Y. 1993. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362:127-132

Kyte J., Doolittle, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol.*157:105-132

Lees-Miller, J., Duan, Y., Teng, G., Thorstad, K., Duff, H. 2000. Novel Gain-of-Function Mechanism in K⁺ Channel-Related Long-QT Syndrome: Altered Gating and Selectivity in the HERG1 N629D Mutant. *Circ Res.* 86:507-513

Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., Barhanin, J. 1996a. A pH-sensitive Yeast Outward Rectifier K⁺ Channel with Two Pore Domains and Novel Gating Properties. *The Journal of Biological Chemistry* 271:4183-4187

Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., Barhanin, J. 1996b. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J.* 15:1004-1011

Lesage, F., Reyes R., Fink M., Duprat F., Guillemare E., Lazdunski M. 1996c. Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO J.* Dec.2;15(23):6400-6407

- Levy, D.I., Deutsch, C. 1996.** Recovery from C-type inactivation is modulated by extracellular potassium. *Biophysical Journal* 70:798-805
- Li, M., Jan, Y.N., Jan, L.Y. 1992.** Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* 257:1225-1230
- Li, M., Unwin, N., Stauffer, K.A., Jan, Y.N., Jan, L.Y. 1994.** Images of purified *Shaker* potassium channels. *Curr. Biol.* 4:110-115
- Liu, Y., Jurman, M.E., Yellen, G. 1996.** Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating. *Neuron* 16:859-867
- Loukin, S.H., Lin, J., Athar, U., Palmer, C., Saimi, Y. 2002a.** The carboxyl tail forms a discrete functional domain that blocks closure of the yeast K⁺ channel. *PNAS* 99:1926-1930
- Loukin, S.H., Saimi, Y. 1999.** K⁺-Dependent Composite Gating of the Yeast K⁺Channel, Tok1. *Biophysical Journal* 77:3060-3070
- Loukin, S.H., Saimi, Y. 2002b.** Carboxyl Tail Prevents Yeast K⁺ Channel Closure: Proposal of an Integrated Model of TOK1 Gating. *Biophysical J.* 82:781-792
- Loukin, S.H., Vaillant, B., Zhou, X.-L., Spalding, E.P., Kung, C., Saimi, Y. 1997.** Random mutagenesis reveals a region important for gating of the yeast K⁺ channel Ykc1. *The EMBO Journal* 16:4817-4825
- MacKinnon, R., Yellen, G. 1990.** Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science* 250:276-279
- Maresova, L., Sychrova, H. 2005.** Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* kha1 deletion mutants. *Mol Microbiol.* 55:588-600
- Masuda, C.A., Ramírez, J., Peña, A., Montero-Lomelí, M. 2000.** Regulation of Monovalent Ion Homeostasis and pH by the Ser-Thr Protein Phosphatase *SIT4* in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 275:30957-30961
- Marten, I., Hoshi, T. 1997.** Voltage-dependent gating characteristics of the K⁺ channel KAT1 dependent on the N and C termini. *PNAS* 94:3448-3453
- Minet, M., Dufour, M.E., Lacroute, F. 1992.** Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *The Plant Journal* 2(3):417-422
- Molina, M.L., Encinar, J.A., Barrera, F.N., Fernandez-Ballester, G., Riquelme, G., Gonzales-Ros, J.M. 2004.** Influence of C-Terminal Protein Domains and Protein-Lipid Interactions on Tetramerization and Stability of the Potassium Channel KcsA. *Biochemistry* 43:14924-14931.
- Molina, A., Ortega-Saenz, P., Lopez-Barneo, J. 1998.** Pore mutations alter closing and opening kinetics in Shaker K⁺ channels. *Journal of Physiology.* 509:327-337

- Mottagui-Tabar, S., Tuite, M.F., Isaksson, L.A. 1998.** The influence of 5' codon context on translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 257:249-254
- Nakamura, R.L., Anderson, J.A., Gaber, R.F. 1997.** Determination of Key Structural Requirements of a K⁺ Channel Pore. *The Journal of Biological Chemistry.* 272(2):1011-1018
- Neher, E. 1992.** Ionenkanäle für die inter- und intrazelluläre Kommunikation (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* 104:837-843
- Nichols, C.G., Lopatin, A.N. 1997.** Inward Rectifier Potassium Channels. *Annu. Rev. Physiol.* 59:171-191
- Numberger, M., Draguhn, A. Patch-Clamp-Technik.** Spektrum Akad. Verl. (1996)
- Pardo, LA., Heinemann, SH., Terlau, H., Ludewig, U., Lorra, C., Pongs, O., Stühmer, W. 1992.** Extracellular K⁺ specifically modulates a rat brain K⁺ channel. *PNAS* 89:2466-2470
- Proft, M., Struhl, K. 2004.** MAP Kinase-Mediated Stress Relief that Precedes and Regulates the Timing of Transcriptional Induction. *Cell* 118:351-361
- Reid., J.D., Lukas, W., Shafaatian, R., Bertl, A., Scheuermann-Kettner, C., Guy, H.R., North, R.A. 1996.** The *S. cerevisiae* Outwardly-Rectifying Potassium Channel (DUK1) Identifies a New Family of Channels With Duplicated Pore Domains. *Receptors and Channels* 4:51-62
- Roberts, S.K. 2003.** TOK Homologue in *Neurospora crassa*: First Cloning and Functional Characterization of an Ion Channel in a Filamentous Fungus. *EUCARYOTIC CELL*, Feb.:181-190
- Rodríguez-Navarro, A. 2000.** Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469:1-30
- Romanos, M.A., Scorer, C.A., Clare, J.J. 1992.** Foreign Gene Expression in Yeast: a Review. *Yeast* 8:423-488
- Sakman, B. 1992.** Elementare Ionenströme und synaptische Übertragung (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* 104:844-856
- Sambrook, J., Russel, D.W. 2001.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J.-M., Gaymard, F., Grignon, C. 1992.** Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256:663-665
- Starace DM., Bezanilla, F. 2004.** A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature* 427:548-553

- Strang, C., Cushman, S., DeRubeis, D., Peterson, D., Pfaffinger, P. 2001.** A Central Role for the T1 Domain in Voltage-gated Potassium Channel Formation and Function. *The Journal of Biological Chemistry* 276:28493-28502
- Terlau, H., Stühmer, W. 1998.** Structure and Function of Voltage-Gated Ion Channels. *Naturwissenschaften* 85:437-444
- Vergani, P., Blatt, M.R. 1999.** Mutations in the yeast two pore K⁺ channel YKC1 identify functional differences between the pore domains. *FEBS Letters* 458:285-291
- Vergani, P., Hamilton, D., Jarvis, S., Blatt, M.R. 1998.** Mutations in the pore regions of the yeast K⁺ channel YKC1 affect gating by extracellular K⁺. *The EMBO Journal*. 17(24): 7190-7198
- Vergani, P., Miosga, T., Jarvis, S., Blatt, M.R. 1997.** Extracellular K⁺ and Ba²⁺ mediate voltage-dependent inactivation of the outward-rectifying K⁺ channel encoded by the yeast gene TOK1. *FEBS Letters* 405:337-344
- Xu, J., Yu, W., Jan, YN., Jan, LY., Li, M. 1995.** Assembly of Voltage-gated Potassium Channels. *The Journal of Biological Chemistry* 270:24761-24768
- Yang, N., George, A.L.Jr., Horn, R. 1996.** Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* 16:113-122
- Zagotta, W.N., Hoshi, T. Aldrich, R.W. 1990.** Restoration of inactivation of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* 250: 568-571
- Zerangue, N., Jan, YN., Jan, LY. 2000.** An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional Shaker channels lacking T1. *PNAS* 97:3591-3595
- Zhou, X.-L., Vaillant, B., Loukin, S.H., Kung, C., Saimi, Y. 1995.** YKC1 encodes the depolarization-activated K⁺ channel in the plasmamembran of yeast. *FEBS Letters* 373:170-176
- 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., Kaufman, 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

Internet

Bezanilla: <http://pb010.anes.ucla.edu/med98a.htm>

ExPASy: <http://www.expasy.ch/prosite/>

Yeast Protein Database: <http://quest7.proteome.com/database/YPD/index.htm>

<http://nobelprize.org/chemistry/laureates/2003/mackinnon-lecture.html>

7. Anhang

7.1 DNA-Sequenz von TOK1 (YJL093C)

```

1  ATGACAAGGT TCATGAACAG CTTTGCCAAA CAAACGCTGG GATATGGCAA
51  TATGGCGACA GTGGAGCAAG AGAGCTCAGC TCAGGCTGTT GATTCTCATT
101  CAAACAACAC ACCGAAGCAA GCTAAGGGTG TTCTTGCAGA GGAACTAAAG
151  GATGCATTGC GGTTCGGGA CGAAAGAGTT AGTATTATTA ATGCAGAGCC
201  TTCTTCAACA CTGTTTCGTCT TTTGGTTTGT GGTTCATGC TATTTCCCTG
251  TGATTACTGC CTGCTTGGGT CCCGTAGCTA AACTATCTC GATAGCCTGT
301  GTAGTTGAAA AATGGAGATC CTTAAAGAAC AACTCCGTGG TGACAAATCC
351  ACGAAGCAAT GACACCGATG TTTTGATGAA TCAAGTAAAG ACAGTTTTTG
401  ATCCTCCTGG TATTTTTGCC GTTAATATCA TCTCTTGGT ACTGGGTTTT
451  ACGTCAAATA TTATACTAAT GCTACATTTT AGTAAGAAGT TGACGTATCT
501  TAAATCTCAG TTAATAAATA TAACAGGATG GACAATAGCT GGAGGGATGC
551  TTTTGGTGGA CGTGATTGTA TGCTCCTTGA ATGACATGCC CAGCATCTAC
601  AGTAAGACTA TCGGATTTTG GTTTCCTGT ATCAGTTCTG GTCTATATTT
651  GGTATGCACC ATTATTTTAA CAATACATTT TATTGGATAT AAATTAGGAA
701  AATATCCTCC AACGTTCAAC CTTTTGCCCA ATGAAAGAAG TATCATGGCA
751  TACACTGTAC TATTGTCTTT ATGGTTGATT TGGGGTGCGG GTATGTTTAG
801  CGGTTTATTG CACATCACTT ACGGAAATGC ATTATATTTT TGCACGGTAT
851  CATTATTAAC CGTGGGACTA GGTGACATCC TGCCCAAGTC GGTGGCGCC
901  AAAATCATGG TTTTAATCTT TTCGCTATCT GGTGTTGTCT TGATGGGTTT
951  AATAGTGTTT ATGACAAGAT CCATCATTTA AAAGTCCTCT GGCCCAATTT
1001 TCTTTTTCCA CAGAGTTGAA AAAGGCAGGT CCAAATCGTG GAAACATTAT
1051 ATGGATAGTA GTAAAAATTT ATCTGAAAGG GAAGCGTTCG ACTTAATGAA
1101 GTGTATCCGA CAAACGGCCT CAAGGAAGCA GCATTGGTTT TCTTTGTCGG
1151 TGACTIONTGC AATTTTCATG GCTTTTTGGT TATTGGGAGC TCTTGTATTC
1201 AAATTCGCAG AAAATTGGTC GTACTIONTCAAT TGTATTTACT TTTGTTTCTT
1251 GTGCTTATTA ACCATTGGAT ACGGAGACTA TGCTCCAAGG ACTGGTGCAG
1301 GCCGTGCTTT TTTTGTGATT TGGGCGTTGG GAGCCGTGCC ATTAATGGGG
1351 GCTATCCTAT CTACAGTCGG TGATCTGTTG TTTGACATTT CCACTIONTCTCT
1401 GGATATTAAG ATCGGTGAAT CATTCAATAA TAAAGTCAAG TCCATCGTTT
1451 TTAATGGGCG TCAAAGAGCA CTTTCCTTTA TGGTGAACAC TGGAGAAATT
1501 TTCGAAGAAT CTGACACAGC TGATGGTGAT CTGGAAGAAA ATACAACGAG
1551 CTCACAATCC AGTCAAATTT CTGAATTCAA CGATAATAAT TCAGAAGAGA
1601 ATGATTCTGG AGTGACATCC CCTCCTGCAA GCCTGCAAGA ATCATIONTCTCT

```

Anhang

1651 TCATTATCAA AAGCATCTAG CCCAGAGGGA ATACTTCCTC TAGAATATGT
1701 TTCTTCTGCT GAATATGCAC TACAGGACTC GGGGACCTGT AATTTAAGGA
1751 ACTTGCAAGA GCTACTTAAA GCCGTCAAAA AACTACATCG GATATGTCTG
1801 GCGGATAAAG ATTACACACT TAGTTTTTCC GACTGGTCGT ACATTCATAA
1851 ACTACATTTG AGGAACATTA CAGATATTGA GGAGTACACA CGCGGACCCG
1901 AATTTTGGAT ATCACCTGAT ACGCCCCTCA AGTTCCCGTT AAATGAACCT
1951 CATTTTGCTT TTATGATGCT TTTCAAGAAC ATAGAAGAAT TAGTTGGTAA
2001 TCTAGTAGAA GACGAAGAGC TTTATAAAGT TATAAGCAAA AGAAAATTTT
2051 TGGGTGAGCA TAGAAAGACA CTTTGA

<u>Aminosäure</u>	3-Buchstaben-Code	1-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Lebenslauf

1. Personalien

Name: Anja Roller
Geburtsdatum: 26.06.1967
Geburtsort: Pforzheim
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Anschrift: Dobelstr. 21
75210 Keltern 1

2. Ausbildung

1973 -	1977	GHS Pfinztal-Berghausen
1977 -	1982	Hauptschule Keltern-Dietlingen
1982 -	1984	Johanna-Wittum-Schule Pforzheim Zweijährige hauswirtschaftlich-sozialpädagogische Berufsfachschule Abschluss: Mittlere Reife
4/1987 -	4/1988	Ausbildung zur Krankenschwester Kreiskrankenhaus Bad Säckingen
4/1988 -	8/1988	Ausbildung zur Kinderkrankenschwester Städtische Kinderklinik Pforzheim
9/1989 -	6/1992	Gertrud-Bäumer-Schule Karlsruhe Ernährungswissenschaftliches Gymnasium Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
10/1992 -	3/1996	Studium Fachrichtung Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe
4/1996 -	12/2001	Studium Fachrichtung Biologie an der Universität Karlsruhe Abschluss: Diplom

3. Bisherige Tätigkeiten

8/1984 -	7/1985	Praktikum im ev. Kindergarten, Keltern-Dietlingen
8/1985 -	10/1985	Aushilfstätigkeit bei Bäckerei Karl Roller, Keltern-Dietlingen
11/1985 -	2/1986	Praktikum im Städtischen Krankenhaus Pforzheim
3/1986 -	3/1987	Aushilfstätigkeit bei Werkzeugbau Vetter GmbH, Keltern-Dietlingen
9/1988 -	8/1989	Aushilfstätigkeit bei Bäckerei Karl Roller, Keltern-Dietlingen
8/1992 -	10/1992	Aushilfstätigkeit bei Bäckerei Karl Roller, Keltern-Dietlingen
1/2000 -	8/2001	Wissenschaftliche Hilfskraft Botanisches Institut 1, Universität Karlsruhe
1/2002 -	6/2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei HD Dr. Adam Bertl, Botanisches Institut 1, Universität Karlsruhe
	seit 6/2002	Wissenschaftliche Hilfskraft (Promotion) Botanisches Institut 1, Universität Karlsruhe