

**Die α -Untereinheiten von Ionenkanälen
assemblieren durch eine Tetramerisierung von
Coiled-Coils**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe Universität
in Frankfurt am Main

von
Marc Jenke
aus Köln

Frankfurt am Main 2002

(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. W. E. Müller

Gutachter: Prof. Dr. G. Lambrecht
Prof. Dr. W. Stühmer

Datum der Disputation: 27.05.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Material.....	12
2.1.1	Material allgemein.....	12
2.1.2	Peptide	14
2.1.3	Eichproteine	14
2.1.4	Chemikalien für die CD-Spektroskopie	15
2.1.5	Material für die Oberflächen-Plasmonresonanz	15
2.1.6	Puffer und Lösungen	16
2.1.6.1	Für die RP-HPLC.....	16
2.1.6.2	Für die CD-Spektroskopie	16
2.1.6.3	Für die Elektrophysiologie	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Sequenzanalysen	17
2.2.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit umgekehrter Phase (RP-HPLC).....	18
2.2.2.1	Analytische RP-HPLC.....	18
2.2.2.2	Semipräparative Peptidaufreinigung durch RP-HPLC.....	18
2.2.3	Massenspektrometrie.....	19
2.2.3.1	Massenbestimmung der Peptide.....	19
2.2.4	Lyophilisieren	20
2.2.5	Bestimmung der Peptidkonzentration in Lösung (Ninhydrin-Analyse).....	20
2.2.6	Gelfiltration.....	20
2.2.7	Lichtstreuung	21
2.2.8	Zirkulardichroismus-Spektroskopie	22
2.2.9	Oberflächen-Plasmonresonanz	23
2.2.9.1	Peptidimmobilisierung.....	24
2.2.9.2	Kinetische Messungen.....	25
2.2.10	Elektrophysiologie	26
2.2.10.1	cRNA Preparation.....	26

2.2.10.2 Elektrophysiologische Messungen.....	27
3 Ergebnisse	28
3.1 Berechnungen und Analysen der Proteinstruktur der TCC-Domäne.....	28
3.2 Die TCC-Peptide.....	31
3.3 Die Struktur der TCC-Peptide	32
3.4 Sekundärstruktur und thermische Stabilität der TCC-Domäne	35
3.5 Peptidinteraktionen: Messungen mit Oberflächen-Plasmonresonanz- Technologie	42
3.6 Die Rolle der TCC-Domäne in der Assemblierung von α -Untereinheiten und in der Ausbildung funktioneller Kanäle	48
4 Diskussion	54
4.1 Die Stöchiometrie und Struktur der Zusammenlagerung der TCC-Peptide.....	54
4.2 Interaktionsmessungen	57
4.3 Elektrophysiologische Messungen.....	59
4.4 Die Funktionalität der TCC-Domäne scheint pathologische relevant zu sein...60	
5 Zusammenfassung	63
6 Literatur.....	65
7 Anhang	75
Danksagung.....	77
Publikationen.....	78
Lebenslauf.....	79

Abbildungen

Abb. 1: Darstellung der Protein-Protein-Interaktion im Coiled-Coil.....	9
Abb. 2: Berechnung der Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer Coiled-Coil Struktur	29
Abb. 3: Tetramere Coiled-Coil Regionen in Ionkanal bildenden Proteinen.....	31
Abb. 5: TCC-ERGinsG ist kein Coiled-Coil	36
Abb. 6: Temperaturabhängige Messung der molaren Elliptizität der TCC-Peptide und der Kontrollen in Natriumphosphat (10 mM, pH 7,4).....	37
Abb. 7: Vergleich des α -helikalen Gehaltes der TCC- und der Kontrollpeptide aus der temperaturabhängigen Messung der molaren Elliptizität in Phosphatpuffer	38
Abb. 8: Schmelzkurven der TCC-Peptide und der Kontrollpeptide in Natriumphosphat (10mM, pH 7,4)	40
Tabelle 1: Immobilisierung der TCC- und Kontrollpeptide auf dem Sensorchip CM542	
Abb. 9: Die Interaktionen der TCC-Peptide	44
Abb. 10: Vergleich der Interaktion der TCC-Peptide mit den Kontrollpeptiden.....	46
Abb. 11: Messung der Interaktion des TCC-Peptids ERG1 und TCCERGinsG	47
Abb. 12: Wiederherstellung der Funktionalität eines mutierten HERG-Kanals durch Einfügung der TCC-Domäne des EAG1-Kanals.....	49
Abb. 13: Verteilung der Fluoreszenz der GFP markierten Kanalkonstrukte.....	50
Abb. 14: Heteromere Interaktion zwischen EAG1-Wildtyp und HERG1:EAG1TCC .	52
Tabelle 2: Pathologisch relevante Mutationen führen zu Sequenzänderungen der TCC- Domänen	61

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Aqua dem.	demineralisiertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
bzw.	beziehungsweise
CD	Zirkulardichroismus
Da	Dalton
$\Delta\epsilon$	Delta Epsilon
EDC	N-ethyl-N'(3-diethyl-aminopropyl) carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde(n)
HAc	Essigsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazino)-ethansulfonsäure
k	Kilo (10^3)
l	Liter
Lsg.	Lösung
-lsg	-lösung
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
min	Minute(n)
μ	Micro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NHS	N-hydroxy-succinimid
NFR	Normal Frog Ringer
OD	optische Dichte
OPR	Oberflächen-Plasmonresonanz
p	Pico (10^{-12})
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff- ionenkonzentration
RP-HPLC	Reversed phase- high performance liquid chromatography
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanzeinheit

s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoracetat
TFE	Trifluorethanol
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen

Aminosäuren:

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

1 Einleitung

Viele der Signaltransduktionswege und regulatorischen Systeme in eukaryotischen Zellen werden von Proteinen mit unterschiedlichen Interaktionsdomänen kontrolliert. Spezifische Interaktion dieser Domänen können mit Proteinen, mit Phospholipiden, mit Nukleinsäuren oder mit sekundären Botenstoffen (Pawson, 1995) stattfinden. Die Interaktionsdomänen sind wichtig für die biologische Funktionalität von Rezeptoren sowohl für extrazelluläre, als auch für intrazelluläre Signale.

Interaktionsdomänen können aus unterschiedlichen Motiven zusammengesetzt sein. Hierzu zählen z.B. leuzinreiche Regionen, HEAT Motive oder WD40 Wiederholungen (Andrade *et al.*, 2001; Groves *et al.*, 1999; Sathe *et al.*, 1995). Die Assemblierung dieser wiederholten Motive resultiert in einer Vielzahl unterschiedlicher Bindungsflächen und diversen spezifischen Bindungsmöglichkeiten.

Gefaltete modulatorische Domänen können als Dimer oder Multimer homomere oder heteromere Interaktionen eingehen. Zu diesen Proteindomänen gehören z.B. die *death domain* oder die *death effector domain*, die apoptotische Signalkaskaden regulieren (Kaufmann *et al.*, 2001; Vaughn *et al.*, 1999).

Coiled-Coils sind helikale Protein-Protein Interaktionsdomänen, die über eine siebenfache Wiederholung in der Aminosäuresequenz verfügen $(a-b-c-d-e-f-g)_n$, wobei die Positionen **a** und **d** bevorzugt mit hydrophoben Aminosäuren besetzt sind (I, L, M, V) (Lupas, 1996). Die Multimerisierung in wässriger Umgebung wird durch die Amphipathizität dieser helikalen Struktur hervorgerufen (Abb. 1). Viele natürlich vorkommende Coiled-Coils liegen als Dimere vor, wie zum Beispiel der GCN4-Leuzin Zipper, ein Transkriptionsfaktor aus der Hefe (Heeckeren *et al.*, 1992) sowie die Bindung zwischen Syntaxin und Snap-25, deren Bindung auf einem dimeren Coiled-Coil (Fasshauer *et al.*, 1997) beruht. Auch tetramere Coiled-Coils wurden sowohl als synthetische (Harbury *et al.*, 1993), als auch als natürlich vorkommende Moleküle (Tarbouriech *et al.*, 2000) beschrieben.

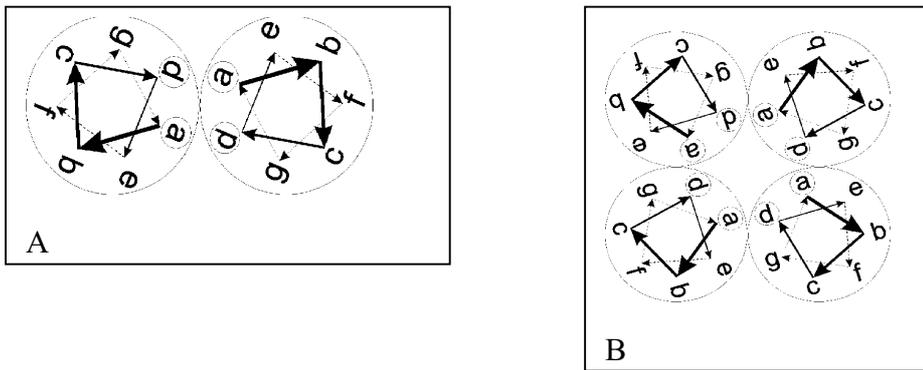


Abb. 1: Darstellung der Protein-Protein-Interaktion im Coiled-Coil

Die Abbildung zeigt die Anordnung der Aminosäuren im „helikalen Rad“. Dabei betrachtet man die Windung der Aminosäuren entlang der Helixachse. Die Aminosäuren sind im Coiled-Coil (102.86° Drehwinkel / Aminosäure) gegenüber der α -helikalen Anordnung (100° Drehwinkel / Aminosäure) superspiralisiert, so dass jede achte Aminosäure übereinander angeordnet ist. Die Protein-Protein-Interaktion wird dabei vom hydrophoben Kern der Strukturen (**a**, **d**) getragen. Dieser hat in der dimeren (**A**) gegenüber der tetrameren Struktur (**B**) eine geringere Ausdehnung. Ein weiterer Unterschied dieser beiden Strukturen besteht in der größeren Annäherung der Positionen **e** und **g** im tetrameren Coiled-Coil.

Eine große Anzahl spannungsabhängiger Kaliumkanäle liegt im funktionellen Zustand als Tetramer (Choe, 2002) vor und verfügt über äquivalente Strukturen. Dazu gehören sechs hydrophobe, membrandurchspannende Segmente (Transmembrandomänen, S1-S6) und ein weiterer hydrophober Bereich H5 zwischen S5 und S6, der die Pore ausbildet (Choe, 2002). Die Pore reicht in die Membran herein, ohne diese jedoch zu durchspannen. Die Pore beinhaltet einen Selektivitätsfilter mit charakteristischer Primärsequenz (Thr-Val-Gly-Tyr-Gly, Doyle *et al.*, 1998). Der Spannungssensor dieser Ionenkanäle befindet sich im vierten Transmembransegment und wird aus Aminosäuren mit positiven Ladungen gebildet (Papazian *et al.*, 1991). Der Amino- und Carboxyterminus dieser Ionenkanäle befindet sich intrazellulär. Die Gruppe der Proteine, für die diese konservierte Struktur charakteristisch ist, wird 6TM1P (sechs membrandurchspannende Segmente und eine Pore) genannt. Zu ihnen zählen die durch zyklische Nucleotide gesteuerten (CNG) Kanäle, die spannungsgesteuerten K^+ -Kanäle der Shaker Familie, die Pflanzenkanäle AKT1 und KAT1 sowie die K^+ -Kanäle der EAG-Familie.

Heteromere Interaktionen zwischen Mitgliedern einer Proteinunterfamilie, z.B. zwischen EAG1 und EAG2 (Schonherr *et al.*, 2002) oder zwischen ERG1, ERG2 und ERG3 (Wimmers *et al.*, 2001), werden im Gegensatz zu Interaktionen mit Mitgliedern einer anderen Proteinunterfamilie als möglich angenommen. Dabei werden, am Beispiel der EAG-Ionenkanäle, EAG1 und 2, ERG1 bis 3 und ELK1 bis 3 jeweils als Proteinunterfamilien der Superfamilie der EAG-Ionenkanäle bezeichnet.

Die für die Selektivität und die Stabilität verantwortlichen molekularen Mechanismen wurden bisher nur in Ansätzen verstanden. Die erste beschriebene Superfamilie der 6TM1P Kanäle, die spannungsabhängigen K⁺-Kanäle (Kv) der *Shaker*-Familie, weisen im funktionellen Zustand eine aus vier α -Untereinheiten gebildete Struktur auf. Die Assemblierung der Proteinuntereinheiten dieser Kv-Kanäle wird von einer Region vermittelt, die als Tetramerisierungsdomäne (T1-Domäne) (Shen *et al.*, 1993) bezeichnet wird. Diese befindet sich im intrazellulären Aminoterminus und wurde kristallisiert (Kreusch *et al.*, 1998). Eine Zerstörung dieser T1-Domäne verhindert die Multimerisierung von α -Untereinheiten und führt daher zu nicht funktionellen Kanälen. Die Funktionalität dieser Kanäle kann jedoch durch Einfügen eines synthetischen Coiled-Coils wiederhergestellt werden (Minor *et al.*, 2000; Zerangue *et al.*, 2000). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass Coiled-Coils für die Multimerisierung von Ionenkanälen verantwortlich sind.

Kaliumkanäle des EAG Typs assemblieren zu einem funktionellen Kanal über eine Domäne am Ende des Carboxyterminus (Ludwig *et al.*, 1997). Computergestützte Analysen der Primärstruktur dieser Domäne ergaben eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung einer Coiled-Coil Struktur. Da für Kaliumkanäle generell eine tetramere Struktur angenommen wird (Choe, 2002), ist es wichtig zu testen, ob die berechnete Coiled-Coil Struktur sich experimentell belegen lässt. Da die Interaktionen zwischen individuellen porenbildenden α -Untereinheiten für die charakteristischen Eigenschaften der Ionenkanäle verantwortlich sind und eine Vielzahl von Ionenkanälen durch Heteromultimerisierungen entsteht, ist die Frage nach der Struktur der Assemblierungsdomäne von substanzieller Wichtigkeit. Sequenzanalysen innerhalb der EAG-Familie, zu denen EAG, ERG und ELK Kanäle zählen, zeigen Domänen mit struktureller Homologie (durch eine Homologie der chemischen Eigenschaft der Aminosäurereste) zu der Assemblierungsdomäne in EAG1.

Elektrophysiologische Messungen von co-exprimierten α -Untereinheiten sind häufig schwierig. Die Unterschiede, die durch die heteromere Assemblierung auftreten, sind nicht offensichtlich, da die Summe der Eigenschaften in gemischten Kanal-Populationen gemessen wird. Um im Vorfeld von elektrophysiologischen Messungen eine Aussage über mögliche Homo- bzw. Hetero-Multimerisierungen treffen zu können, wurde im Zuge dieser Arbeit eine neue Methode entwickelt. Mit dieser Methode besteht die Möglichkeit, die Assemblierung unter Zuhilfenahme der Oberflächen-Plasmonresonanz an synthetischen Peptiden - homolog den C-terminalen Assemblierungsdomänen - zu testen. Die Ergebnisse der darauf basierenden Interaktionsstudie wurden in elektrophysiologischen Messungen an funktionellen Kanälen, die in *Xenopus* Oozyten exprimiert wurden, bestätigt.

In silico durchgeführte Sequenzanalysen von weiteren Ionenkanälen zeigen, dass eine Coiled-Coil Struktur mit hoher Wahrscheinlichkeit für diese Moleküle angenommen werden kann. Daraus kann geschlossen werden, dass dieser Mechanismus der Heteromultimerisierung eine weitverbreitete Fähigkeit dieser Proteine darstellt, der mittels Oberflächen-Plasmonresonanz untersucht werden kann.

Mutationen in Genen, die für Ionenkanäle kodieren, bzw. Fehlfunktionen von Ionenkanälen können mit humanen Krankheiten in Verbindung gebracht werden. Zu diesen Krankheiten zählen zum Beispiel Fehlfunktionen der Repolarisation des Herzens (Wang *et al.* 1996; Curran *et al.* 1995), Formen der Ataxie (Ophoff *et al.*, 1996) und Epilepsie (Biervert *et al.*, 1998). Des Weiteren konnte eine Beteiligung von Kaliumkanälen an der Zellproliferation und dem Zellzyklus nachgewiesen werden (Pardo *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde weiterhin untersucht, ob natürlich vorkommende Mutationen im Bereich der Assemblierungsdomäne konzentriert auftreten und zur Expression von dysfunktionellen Proteinen führen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Material allgemein

Vydac C18 250 x 4,6 mm RP-HPLC-Säule	MZ Analystechnik, Deutschland
Vydac C18 250 x 10 mm RP-HPLC-Säule	MZ Analystechnik, Deutschland
HPLC-System 850	(Säulenofen, Pumpe, Steu- ereinheit)
HPLC-Injektionsspritzen	Hamilton GmbH, Deutsch- land
Gefriertrocknungsapparatur Christ alpha I-5	Christ, Deutschland
Finnigan MAT Massenspektrometer TSQ 7000	Thermoquest Deutschland
BioCad Vision - Perfusion Chromatography System	PerSeptive Biosystems, USA
SUPERDEX 75 HR 10/30	Pharmacia Biotech
Aminosäure-Analysator 6500	Beckmann
CD-Spektroskop JA-720	Jasco, Labor- u. Datentech- nik GmbH, Deutschland
PTC-315 Temperatur-Kontroll-Einheit	Jasco, Labor- u. Datentech- nik GmbH, Deutschland
SUPRASIL Küvetten 100-QS 2mm	HELLMA, Deutschland
Centrifuge 5415C	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Deutschland
Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments, Deutschland
BS4402/A	Heraeus Instruments, Deutschland

J2-MI	Beckmann, Deutschland
Rotor JA-14	Beckmann, Deutschland
Rotor JA-10	Beckmann, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Deutschland
Vortex-Genie2	Scientific Industries
Waage MC1 Analytic AC 120 S	Satorius, Deutschland
Inkubationsschüttler Innova 4430	VWR int., Deutschland
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Deutschland
2,0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Deutschland
0,45 µm u. 0,22 µm Filter	Nalgene, USA
0,22 µm Sterilfiltereinheit (500 ml)	Millipore
DAWN DSP Laser Photometer	Wyatt Technology, USA
Optilab DSP Interferometric Refractometer	Wyatt Technology, USA
TEC-10CD Verstärker	npi Electronics, Deutsch- land
CHO-Zellen	DSMZ, Deutschland
<i>Xenopus</i> Oozyten	MPI f. exp. Med., Deutschland

2.1.2 Peptide

TCC-EAG1	Dr. Corinna Morys-Wortmann, MPI f. exp. Med., Deutschland
TCC-EAG2	Biosyntan, Deutschland
TCC-ERG1	Biosyntan, Deutschland
TCC-EAG1L20Y	Dr. Klaus Eckart, MPI f. exp. Med., Deutschland
TCC-EAG2L13Y	Dr. Klaus Eckart, MPI f. exp. Med., Deutschland
TCC-ERG1L20Y	Dr. Klaus Eckart, MPI f. exp. Med., Deutschland
TCC-ERGsG	Dr. Klaus Eckart, MPI f. exp. Med., Deutschland

Alle Peptide wurden in doppelt destilliertem Wasser [2mg/ml] gelöst, in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zu jeweils 50 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.1.3 Eichproteine

Gel Filtration Calibration Kit	Amersham Pharmacia Biotech
Proteinkinase A Inhibitor	Calbiochem

2.1.4 Chemikalien für die CD-Spektroskopie

Guanidiniumchlorid	f. biochem. Zwecke	Merck, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	SUPRAPUR	Merck, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat	SUPRAPUR	Merck, Deutschland
2,2,2-Trifluorethanol		Merck, Deutschland

2.1.5 Material für die Oberflächen-Plasmonresonanz

Biacore 2000		Biacore, Schweden
Sensorchip		CM5 research grade
HBS	10 mM	HEPES, pH 7,4
	150 mM	NaCl
	3 mM	EDTA
		0,005% (v/v) TWEEN 20, 0,22µm gefiltert und entgast
Immobilisierungs Reagenzien	200 mM	EDC
	50 mM	NHS
	1 M	Ethanolamin
Acetatpuffer	10 mM,	pH 4, pH 4,5, pH 5, pH 5,5
Guanidiniumhydrochlorid-Lösung	6 M	

2.1.6 Puffer und Lösungen

2.1.6.1 Für die RP-HPLC

Lösung A	0,05%(v/v)	TFA in Wasser (HPLC-grade)
Lösung B	80% (v/v)	Acetonitril
	0,05%(v/v)	TFA in Wasser (HPLC-grade)

2.1.6.2 Für die CD-Spektroskopie

Phosphat-Saline	10 mM	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄
	150 mM	NaCl, pH 7,4
Guanidinium-Hydrochlorid	3,5 M	
2,2,2-Trifluorethanol		
Mineralöl		

2.1.6.3 Für die Elektrophysiologie

Barths Lösung	0,33 mM	Ca(NO ₃) ₂
	0,41 mM	CaCl ₂
NFR	10 mM	HEPES / NaOH, pH7,2
	30 mM	KCl
	2 mM	MgCl ₂
	1,8 mM	CaCl ₂
	85 mM	NaCl

2.2 Methoden

2.2.1 Sequenzanalysen

Die Vorhersage der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Coiled-Coil Struktur wurde mit dem Programm Coils (Version 2.2, Lupas *et al.*, 1991) (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) getroffen. Berechnungen der Signifikanz der Änderung der Aminosäureverteilung innerhalb des Motivs der siebenfachen Wiederholung von Coiled-Coils beruhen auf dem Chi Quadrat Test (χ^2 ist ein Maß der Abweichung einer empirischen Häufigkeitsverteilung von einer theoretisch angenommenen). Die Daten der Aminosäureverteilung in dem Motiv der siebenfachen Wiederholung (*a-b-c-d-e-f-g*)_n in dimerischen Proteinen des MTK-Typs (Filament-Proteine, des Myosin-, Tropomyosin- und Keratin-Typs, Cohen and Parry, 1990) sowie die generelle Häufigkeit von Aminosäuren an bestimmten Positionen von Proteinen, die in GenBank publiziert sind, beruhen ebenfalls auf Lupas *et al.*, 1991. 217 Coiled-Coils des *Leucine-Zipper-* (LZ-) Typs aus Transkriptionsfaktoren (GenBank) wurden nach maximaler Hydrophobizität an den Positionen **a** und **d** geordnet und bilden die Grundlage der Analysen mit dem Programm Coils (Version 2.2).

Die für diese Arbeit analysierten Domänen sind: EAG1, 2 (Acc. No. AF078741, EST-Klon U69185); ERG1-3 (CAB09536, AAB94742, AAB94741); ELK1-3 (CAA07587, CAA07586, AAC61520); KCNQ1-5 (AAC51776, CAA75348, AAB97314, AAD14681, AAF73446); CNGA1-3 (P29973, Q00195, AAC17440); SK1-3 (AAB82740, AAB09563, AAB81653); KCa4 (AAC51913), PKD1, 2, L, REJ (AAB59488, AAC16004, AAD41638, AAD18021); PCL2 (AAF65622); TRPC1, 3-7 (CAA61447, AAC51653, AAD51736, AAF00002, AAC63289, BAA95563); hMTR1 (AAF26288); mChaK (AAF73131); hMLSN1 (AAC80000) und TRP2 (AAD31453).

2.2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit umgekehrter Phase (RP-HPLC)

Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit umgekehrter Phase erfolgt die Auftrennung der Proben an einer unpolaren Säulenoberfläche. Als Laufmittel wird eine Kombination aus einer wässrigen (z.B. Wasser / TFA) und einer organischen (z.B. Acetonitril / Wasser / TFA) Lösung eingesetzt.

2.2.2.1 Analytische RP-HPLC

Eine Spatelspitze des Peptids wurde in 50 µl Puffer A (2.1.6.1) gelöst und auf die analytische HPLC-Säule, Vydac C18 250 x 4,6 mm, injiziert. Die Auftrennung erfolgte in einem linearen Gradienten von 0-90% Puffer B (2.1.6.1) in 90 min, bei einer Flussrate von 1,0 ml / min und bei einer konstanten Temperatur von 40°C. Die Puffer wurden durch ständige Heliumspülung entgast.

Die Detektion erfolgte durch fotometrische Messung der Peptidbindung bei 214 nm. Bei jedem Schreiberausschlag wurde die Probe mit einem 15 ml Falcon-Gefäß fraktioniert. Die Fraktion des Hauptgipfels wurde jeweils mittels Massenspektrometrie (2.2.3) analysiert.

2.2.2.2 Semipräparative Peptidaufreinigung durch RP-HPLC

Für die Aufreinigung der Peptide wurde eine semipräparative HPLC-Säule (Vydac C18 250 x 10 mm RP-HPLC-Säule) verwendet. Sie hat einen Innendurchmesser von 10 mm und eine Länge von 250 mm. Es wurde bei einem Fluss von 5,0 ml / min gearbeitet und bei einer Wellenlänge von 214 nm detektiert. Der Gradient wurde basierend auf den Ergebnissen der analytischen HPLC-Läufe von 40% auf 80% Puffer B (2.1.6.1) in 60 min verändert. Als Puffer diente das unter 2.1.6.1 beschriebene Puffersystem. Für eine saubere Trennung wurden pro Lauf 25 mg des Rohpeptids in 2 ml Puffer A (2.1.6.1) gelöst auf die Säule gegeben. Insgesamt wurden 75 mg des Rohpeptids gereinigt. Der Hauptpeak wurde nach Schreiberausschlag aufgefangen, die drei Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

2.2.3 Massenspektrometrie

Die Massenbestimmungen der synthetischen Peptide erfolgte durch die Nano-Elektrospray-Methode (Wilm *et al.*, 1994) an einem Finnigan TSQ 7000 Massenspektrometer. Dafür wurde die Probe in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und ca. 5 μ l der Lösung in eine fein ausgezogene und mit Gold beschichtete Glaskapillare gefüllt. Die Kapillare wurde in eine Halterung eingespannt und unter elektrische Hochspannung gesetzt. Die Spitze der Kapillare wurde 1-3 mm vor dem beheizten Einlass des Massenspektrometers fokussiert. Durch die Spannungsdifferenz zwischen Probeneinlass und Kapillare kommt es zur Ausbildung eines Sprühkegels geladener Tröpfchen, deren Lösungsmittelanteil am heißen Probeneinlass schnell verdampft. Die goldbeschichtete Glaskapillare bildet die Gegenelektrode zu dem Probeneinlass, die zur Erzeugung der für den Ionisierungsprozess notwendigen Potentialdifferenz benötigt wird. Frei gewordenen Elektronen stoßen mit den Probenmolekülen zusammen, wobei weitere Elektronen entstehen. Dabei entstehen größtenteils positiv geladene Ionen mit einfacher Ladung nach folgendem Muster: $M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$. Labile Bindungen können bei der Ionisierung auseinander brechen. Die positivgeladenen Probenmoleküle gelangen in der Gasphase in das Gerät. Je nach unterschiedlichem Masse-zu-Ladungs Verhältnis findet eine andere Ablenkung im magnetischen Feld statt, wodurch die Massen bestimmbar werden.

2.2.3.1 Massenbestimmung der Peptide

Die Peptide wurden in einem Gemisch aus Wasser/Methanol 1:1 (v/v), das 0,5% (v/v) Essigsäure enthielt, gelöst und im positiven Modus vermessen. Im positivem Modus werden die Moleküle protoniert, was sie um 1 Da schwerer macht. Auch mehrfache Protonierungen sind, abhängig von der Zahl der basischen Seitenketten, möglich. Mehrfach protonierte Moleküle werden in dem Gerät entsprechend ihrer Ladungszahl (z) z-fach schneller beschleunigt und erscheinen so nur mit einem entsprechenden Bruchteil ihrer eigentlichen Masse in der Auswertung (die doppelte Ladung erscheint in der Auswertung mit der Hälfte der Masse). Diese Ladungsverteilungen wurden im angeschlossenen Rechner durch das Programm SPEC ausgewertet.

2.2.4 Lyophilisieren

Beim Lyophilisieren (Gefriertrocknen) wird das Wasser direkt aus der festen Phase sublimiert.

Durch 4 h Stickstoffbegasung des in HPLC-Puffer gelösten Peptids TCC-EAG1 wurde das Acetonitril unter dem Abzug aus der Lösung evakuiert. Die acetonitrilfreie Lösung wurde in flüssigem Stickstoff einrotiert und bei 0,370 mbar für 15 h lyophilisiert.

2.2.5 Bestimmung der Peptidkonzentration in Lösung (Ninhydrin-Analyse)

Zur Bestimmung des Peptidanteils in Lösung wurden die Peptide (2.1.2) einer Ninhydrin-Analyse unterzogen. Die Peptide wurden in 6 M HCl bei 110°C für 24h hydrolysiert. Das Gemisch der freien Aminosäuren wird chromatographisch über eine Kationenaustauschersäule durch einen ansteigenden pH-Gradienten des Lösungsmittels getrennt. Am Ende der Säule befindet sich ein Analysator, ein Reservoir, das den Farbindikator Ninhydrin enthält. Durch Erhitzen bildet sich ein violett gefärbtes Derivat aus Ninhydrin und einer α -Aminosäure, dessen Intensität proportional zur Stoffmenge der Aminosäure ist. Die OD wird bei 570 nm gemessen und als Funktion des eluierten Volumens aufgezeichnet.

Die Auswertung erfolgt durch die Beckmann-Analyse-Software.

2.2.6 Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde mit einer Superdex 75 HR 10/30 Säule in sterilgefiltertem PBS (0,22 μ m Filter) bei einer Flussrate von 0,5 ml / min durchgeführt. In dem zweiten Versuchsteil wurde 0,22 μ m gefiltertes 6 M Guanidinium-Hydrochlorid als Laufpuffer eingesetzt. Das Retentionsvolumen der Eichproteine und der Peptide wurde gleichzeitig bei 222 nm und bei 280 nm gemessen und in K_{av} (Formel s. Seite 18) umgerechnet. Eine Eichgerade zur Berechnung des Molekulargewichts von unbekanntem Proteinen wurde mit dem K_{av} der Eichproteine gegen den Logarithmus ihres Molekulargewichts erstellt.

Die Berechnung des K_{av} der Peptide erfolgte durch die Formel:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_e = Retentionsvolumen der Proteine (Retentionsvolumen= Retentionszeit x Flussrate)

V_o = Ausschlussvolumen der Säule

V_t = Bettvolumen der Säule

Für die Berechnung des K_{av} der Eichproteine und des Molekulargewichts der Peptide wurden in die 100µl Auftragsschleife der BioCad Vision Anlage nacheinander jeweils 100 µl jeder Eichproteinlösung (Anhang B) und jeder Peptidlösung (2.1.2) injiziert. Die Peptide wurden mit 10 fach konzentriertem PBS auf die Salzkonzentration des Laufmittels PBS eingestellt. Vom Programm gesteuert wurden 10 µl, 20 µl, 30 µl und 40 µl der Protein- bzw. Peptidlösung automatisch injiziert. Anschließend wurde der durch Diffusion in der Schleife verbliebene Proteinrest mit 100µl des Laufmittels aufgetragen. Ein Zyklus dauerte 45 min. Die Retentionsvolumina wurden von dem Programm BioCad Vision Version 3.00 aufgezeichnet.

2.2.7 Lichtstreuung

Das Prinzip der Lichtstreuung (MALLS, engl.: Multi Angle Laser Light Scattering) basiert auf der Tatsache, dass große Moleküle Licht stärker streuen, als kleine Moleküle. Während eines chromatographischen Experiments misst der MALLS-Detektor den Grad des gestreuten Lichts eines Laserstrahls in 18 verschiedenen Winkeln. Die Ausgabe des MALLS-Detektors ist proportional zu der Konzentration multipliziert mit dem Molekulargewicht bei Makromolekülen (Wyatt, 1993).

Die Lichtstreuung wurde als kombinierte Methode durchgeführt. Sie umfasst eine Gelelutionschromatographie verbunden mit der Messung der Lichtstreuung kombiniert mit einem Refraktometer. Die Gelelutionschromatographie wurde mit einer Superdex 75 HR 10/30 Säule in sterilgefiltertem (0,22 µm Filter) PBS bei einer Flussrate von 0,5 ml / min durchgeführt. Es wurden jeweils 150 µl der Peptidlösung (2.1.2) aufgetragen, die zuvor mit konzentriertem PBS auf die Salzkonzentration des Laufmittels gebracht wurden. Die Elutionsprofile wurden bei einer UV-Absorption von 280 nm aufgezeichnet. Die Lichtstreuung wurde bei einer Wellenlänge von 680 nm vom DAWN DSP Laser Photometer (Wyatt Technology, USA) in 18 Winkeln gemessen.

Der Brechungsindex wurde vom Optilab DSP Interferometric Refractometer (Wyatt Technology, USA) gemessen.

Die Änderung des Refraktionsindex einer Lösung in Abhängigkeit von der Konzentration gelöster Moleküle (dn/dc -Wert) ist für Proteine in wässriger Lösung annähernd konstant und wurde mit dem Wert 0,185 (Wen *et al.*, 1996) für die Analysen eingesetzt. Die Berechnung des Molekulargewichts wurde entsprechend der Analyse-Software Astra durchgeführt.

2.2.8 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Zirkulardichroismus-Spektroskopie ist eine Form der Lichtabsorptions-Spektroskopie, bei der die unterschiedliche Absorption rechts und links zirkularpolarisierten Lichts einer chiralen Substanz gemessen wird. Hierzu zählen chirale Zentren an asymmetrischen C-Atomen und chirale Strukturen, z.B. α -Helices und β -Faltblätter.

Die mittels Zirkulardichroismus gemessenen Spektren (CD-Spektren) wurden von 260 nm bis 190 nm mit einer Schrittweite von 1 nm mit einem Jasco JA-720 CD-Spektroskop, ausgestattet mit der Jasco PTC-315 Temperatur-Kontroll-Einheit, aufgenommen. Jedes Spektrum setzt sich aus 5 bis 10 Einzelmessungen zusammen.

Für die Messungen wurden spannungsfreie und spektralabgeglichene Suprasil-Küvetten mit einer Pfadlänge von 0,2 cm der Firma HELLMMA (Deutschland) benutzt. Vor jeder Messung wurde die küvetten- und lösungsmittelspezifische Basislinie aufgenommen. Diese wurde später von der jeweiligen Messung subtrahiert. In den Messungen wurde ein Volumen von 450 μ l Peptidlösung eingesetzt. Zur Herstellung der Lösungsmittel wurden hochreine Chemikalien verwendet. Die Lösungen wurden vor dem Gebrauch im Vakuum entgast. CD-Spektren zur Untersuchung der Sekundärstruktur in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration und der Ionenstärke der Lösung wurden bei 20°C, jeweils in PBS und in 10 mM Natriumphosphat, durchgeführt. Der maximale α -helikale Anteil der Sekundärstruktur am Gesamtspektrum wurde in Trifluorethanol (TFE) (Chiang *et al.*, 1996) gemessen. Die Untersuchungen der thermodynamischen Stabilität wurden bei Temperaturen von 0°C bis 90°C und bei einer Wellenlänge von 222 nm mit anschließender Renaturierung (90°C – 0°C) durchgeführt. Die Temperatur stieg bei diesen Messungen um 2°C / min. In diesem Versuchsteil wurden Natriump-

hosphat (10 mM, pH 7,4) und Guanidiniumhydrochlorid (3,5 M) als Lösung eingesetzt. Die Proben wurden mit 150 μ l Mineralöl überschichtet und die Küvetten mit thermostabiler Folie überklebt.

Alle Proteine wurden erst nach Erreichen des Bindungsgleichgewichts für Messungen eingesetzt.

Die vom CD-Spektroskop ausgegebenen Änderungen des Drehwinkels wurden mit dem Programm Excel in $\Delta\epsilon$ nach folgender Formel umgerechnet:

$$\Delta\epsilon = (([\Theta]_{\text{obs}} \times \text{MW}) / (10 \times l \times n \times c)) / 3298$$

$[\Theta]_{\text{obs}}$ = gemessene Elliptizität [mdeg]

MW = Molekulargewicht [g/mol]

l = Pfadlänge [cm]

n = Anzahl der Aminosäuren

c = Konz. [g/ml]

Die CD-Spektren wurden mit dem Programm CDNN (Böhm, 1992)¹ evaluiert.

2.2.9 Oberflächen-Plasmonresonanz

Ein Proteininteraktionsassay wurde mit einem Biacore 2000 (Biacore, Schweden) aufgenommen. Das Biacore-Gerät ermöglicht über die Oberflächen-Plasmonresonanz (OPR) Technologie kinetische Echtzeit-Messungen einer bimolekularen Interaktion.

Um die Oberflächen-Plasmonresonanz Technologie zu verstehen, muss zunächst das Phänomen der Totalen Internen Reflexion (TIR) beschrieben werden. Wenn ein Lichtstrahl auf eine Grenzfläche zwischen einem Medium mit hohem Brechungsindex und einem Medium mit niedrigen Brechungsindex trifft, unter einem Einfallswinkel der oberhalb des kritischen Winkels liegt, so wird das Licht total reflektiert. Der Lichtstrahl setzt sich im höher refraktiven Medium fort. Dabei wird an der Grenzfläche keine Energie absorbiert. Eine evaneszierende Welle dringt in das Medium mit dem niedrigeren Brechungsindex ein. Bei der Beschichtung der TIR-Grenzschicht mit einer aufgedampften Goldschicht werden elektromagnetische Oberflächenplasmon-Wellen zur Fortpflanzung in die Grenzschicht angeregt, was zu einer verstärkten evaneszierenden Welle führt.

¹ <http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/index.html>

OPR verursacht eine Reduktion der Intensität des reflektierten Lichts in einem speziellen Winkel. Dieser Winkel ändert sich mit der Änderung des Refraktionsindex innerhalb der Durchdringungstiefe der evaneszierenden Welle im Flusszellensystem. Die Intensität des reflektierten Lichts wird mit Hilfe eines Fotodetektor Arrays gemessen. Bimolekulare Interaktionen an der Sensorchipoberfläche verändern den Brechungsindex der Lösung innerhalb der Durchdringungstiefe der evaneszierenden Welle. Die daraus resultierende Änderung des Winkels der reduzierten Intensität im reflektierten Licht ist das Ergebnis der Brechungsindex Veränderung. Diese Änderung wird von dem Array-Detektor gemessen und in ein sogenanntes „Response Signal“ konvertiert, das über die Zeit aufgelöst das Sensogramm ergibt. Die Brechungsindexverschiebung ist für Proteine, Peptide und Nukleinsäuren nahezu gleich. Daher werden mit der Oberflächen-Plasmonresonanz Technologie reine Massenkonzentrationsunterschiede gemessen.

Eine Resonanzeinheit entspricht einem Picogramm Masse.

Die Oberflächen-Plasmonresonanz Technologie wird detailliert von Jönsson *et al.*, 1991 und Karlsson *et al.*, 1991 beschrieben.

2.2.9.1 Peptidimmobilisierung

Die Peptide (2.1.2) wurden bei einer Flussrate von 10 μl / min auf dem dextranbeschichteten Sensor Chips „CM5 Research Grade“ (Biacore, Schweden) immobilisiert. Die carboxylierte Dextranoberfläche wurde durch eine Injektion von 40 μl 0,2 M N-ethyl-N‘(3-diethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) 1 : 1 gemischt mit 0,05 M N-hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert. Die Immobilisierung der einzelnen Peptide erfolgte in 5 mM Acetat-Puffern (2.1.5). Es wurden etwa 150 bis 320 Resonanzeinheiten (RU) auf der Chip-Oberfläche immobilisiert.

Folgende Peptide wurden auf CM5-Chips (Biacore) unter folgenden Bedingungen immobilisiert:

Peptid	Volumen [μ l]	Konz. [μ M]	Acetatpuffer
TCC-EAG1	50,0	1,3	pH 4,5
TCC-EAG2	50,0	2,1	pH 4,5
TCC-ERG1	150,5	3,2	pH 4,0
TCC-EAG1L20Y	40,0	3,1	pH 4,5
TCC-EAG2L13Y	50,0	2,6	pH 4,5
TCC-ERG1L20Y	40,0	3,3	pH 4,5
TCC-ERGsG	50,0	4,0	pH 4,0

Die immobilisierten RU beziehen sich auf errechnete Werte, nach einer zweiminütigen Normalisierung mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid-Lösung und anschließender Deaktivierung der Oberfläche mit 40 μ l 1 M Ethanolamin pH 8,5. Der eingesetzte Laufpuffer HBS (2.1.5), wie auch alle anderen Lösungen, wurde vor Gebrauch gefiltert und durch Vakuum entgast (0,22 μ m Sterilfiltereinheit).

Die Reaktionstemperatur im Biacore 2000 lag während aller Versuche konstant bei 25 °C. Die Thermoreaktionsgefäßhalter wurden auf 4 °C gekühlt.

2.2.9.2 Kinetische Messungen

Das Biacore Gerät wurde für die kinetischen Messungen programmiert. Als Laufpuffer diente HBS pH 7,4. Jedes Peptid (2.1.2) wurde in Konzentrationen von 3 μ M, 1 μ M, 300 nM, 100 nM, 30 nM und 10 nM in HBS (pH 7,4) aufgenommen und mit 20 μ l / min über die beschichtete Chipoberfläche gegeben. Jede Konzentration wurde dreimal nacheinander gemessen und jedes Peptid in Lösung gegen die gebundenen Peptide als mögliche Interaktionspartner getestet.

Die Peptide hatten eine Kontaktzeit von 480 s mit dem jeweils gebundenen Peptid und eine Dissoziationsphase von 600 s. Während der Dissoziationsphase wurde die Reaktionsfläche nur mit Laufpuffer gespült. Vor jeder Peptidinjektion wurde die Oberfläche für 2 min mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid-Lösung regeneriert, die durch 15 min

Spülen mit HBS wieder entfernt wurde. Schläuche, Reaktionswege und die Injektionsnadel wurden über ein zusätzliches HBS-Reservoir gereinigt. Die Daten wurden mit einer Rate von 1 Hz von der Biacore 2000 Control Software Version 3.1 aufgenommen. Eine aktivierte und anschließend deaktivierte Flusszelle diente als Kontrolle. Jedes Sensogramm wurde durch Online-Subtraktion berichtigt, indem die Daten der Kontrollzelle von den Messdaten subtrahiert wurden.

2.2.10 Elektrophysiologie²

2.2.10.1 cRNA Preparation

Die in den elektrophysiologischen Messungen eingesetzten Kaliumkanalkonstrukte (Anhang C) wurden durch eine Änderung der DNA-Sequenz im offenen Leserahmen des hERG1 Cboxyterminus (HERG-TCCERGinsG, basierend auf der *frame shift* Mutation G1031fs/24, Splawski *et al.*, 2001), oder durch einen Austausch der für die TCC-Domäne kodierenden Region von hERG1 durch die entsprechende Region aus EAG1 hergestellt. Die cDNA-Konstrukte wurden in den Expressionsvektor pSGEM (M. Hollmann, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin) inkloniert. cRNAs wurden mit einem T7 Promotor enthaltenden Konstrukt nach einem Standardprotokoll (Krieg *et al.*, 1987) hergestellt und mit dem „RiboGreen RNA quantification Kit“ (Molecular Probes) nach der Anleitung des Herstellers quantifiziert. Die cRNAs wurden in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert (Stühmer, 1992). Für homomere Expressionsuntersuchungen wurde 15-30 pg der heag1, herg1 oder herg1-TCC-eag1 cRNA in die Oozyten injiziert. Für die Co-Expressionsexperimente wurden 20 pg der heag1 und 80 pg herg1 cRNA, respektive 20 pg der heag1 und 80 pg herg1-TCC-eag1 cRNA in die Oozyten injiziert. Die Oozyten wurden in Barths Medium bei 18°C inkubiert.

² Die Elektrophysiologie wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Francisco Monje durchgeführt.

2.2.10.2 Elektrophysiologische Messungen

1-7 Tage nach der Injektion der cRNA, wurden makroskopische Kalium-Ströme unter Zuhilfenahme der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (TEVC) aufgezeichnet. Der Widerstand der intrazellulären Elektroden, die mit 2 M KCl-Lösung gefüllt waren, lag zwischen 0,6 – 1 M Ω . Das angelegte Potential lag bei –80 mV in allen Experimenten. Eine Korrektur für kapazitive-, transiente- und Leckströme wurde systematisch unter Verwendung eines P/n Protokolls während der Messung durchgeführt. Die Daten wurden durch die Puls-Puls Fit Software (HEKA-Elektronis, Deutschland) erfasst und mit dem Programm IgorPro (WaveMetrics, USA) analysiert. Als externe Lösung wurde NFR (2.1.6.3) in den Messungen eingesetzt. Die Experimente fanden bei einer Raumtemperatur von 20 – 22 °C statt.

3 Ergebnisse

3.1 Berechnungen und Analysen der Proteinstruktur der TCC-Domäne

Berechnungen zur Voraussage der Sekundärstruktur von Ionenkanälen mit sechs Transmembransegmenten (s. 2.2.1) ergeben eine hohe Wahrscheinlichkeit zur Bildung einer Coiled-Coil Struktur (Lupas *et al.*, 1991) im C-Terminus (Abb. 2). Coiled-Coil Motive bestehen aus helikal angeordnete Aminosäuren, die sich zur Ausbildung multimerer Strukturen in einer Superhelix umeinanderwinden (Pauling *et al.*, 1953; Crick, 1953). Diese Struktur wurde zunächst in den filamentösen Proteinen Vimentin (Osborn *et al.*, 1986) und α -Keratin (Pauling, 1953) gefunden und als Protein-Protein-Interaktionsdomäne definiert (Landschulz *et al.*, 1988). Auch die Dimerisierung vieler Transkriptionsfaktoren (sogenannte Leuzin-Zipper) wird durch Coiled-Coils vermittelt (O'Shea *et al.*, 1989; Landschulz *et al.*, 1988).

Die Primärsequenz der Assemblierungsdomäne des EAG-Typs zeigt das für Coiled-Coils charakteristische Motiv von jeweils sieben aufeinander folgender Aminosäuren $(a-b-c-d-e-f-g)_n$, wobei an den Positionen **a** und **d** bevorzugt hydrophobe Aminosäuren stehen und die anderen Positionen (**b-c**, **e-f-g**) zumeist mit polaren und geladenen Aminosäuren besetzt sind. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer amphipathischen Helix (Harbury *et al.*, 1993). Der energetische Grund für diese Zusammenlagerung ist, dass alle hydrophoben Aminosäuren im Kern der α -helikalen Struktur abgeschirmt und geschützt gegen das Wasser im Zytoplasma vorliegen.

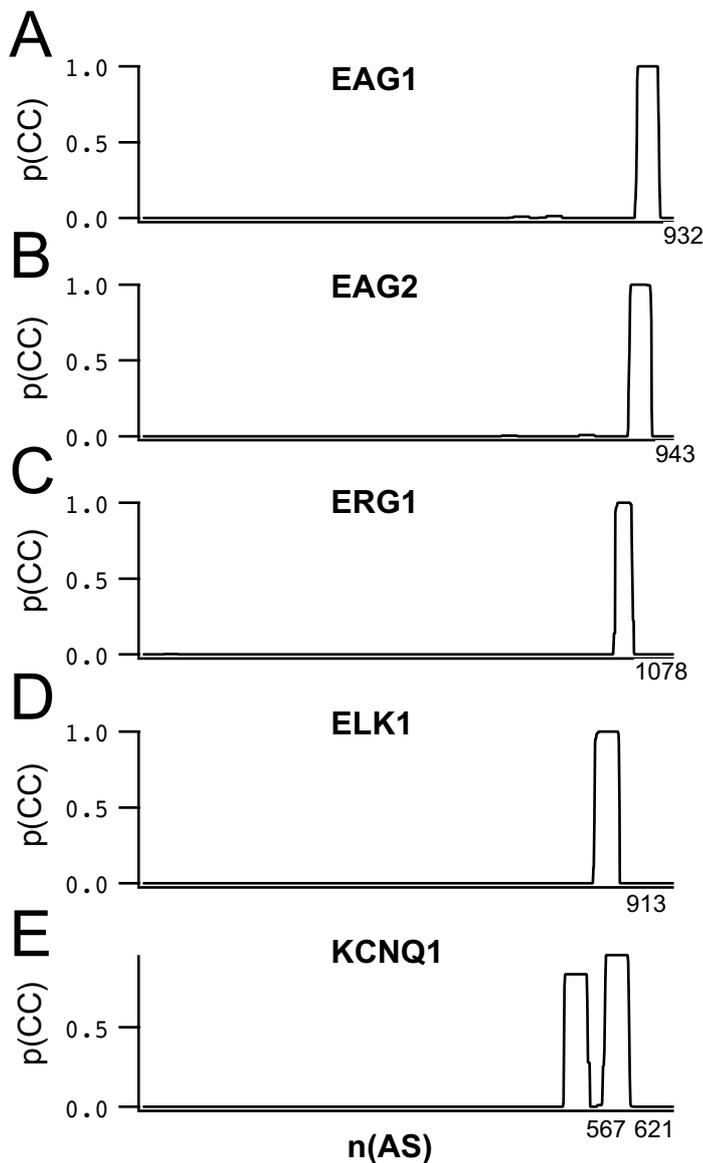


Abb. 2: Berechnung der Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer Coiled-Coil Struktur

In silico Analyse der Aminosäuresequenz von Ionenkanalproteinen A EAG1, B EAG2, C ERG1, D ELK1, E KCNQ1 mit dem Programm Coils (Version 2.2, Lupas *et al.*, 1996). Die Kanäle zeigen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Coiled-Coil Struktur im C-Terminus. Auf der Ordinate ist die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer Coiled-Coil Struktur aufgetragen, auf der Abzisse die Anzahl der Aminosäuren ($n(AS)$) und die Position der letzten Aminosäure, die in der Assemblierung zu einem Coiled-Coil involviert ist

In EAG- und anderen (s. 2.2.1) Ionenkanälen ist die Domäne mit der hohen Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer Coiled-Coil Struktur identisch zu der Domäne, die benötigt wird, um funktionelle Multimere auszubilden (Ludwig *et al.*, 1997; Schmitt *et*

al., 2000). Diese Domäne wird im weiteren Verlauf als „Tetramerisierende Coiled-Coil Domäne“ (TCC) bezeichnet. Computergestützte Analysen, die im Zuge dieser Arbeit angefertigt wurden, ergeben, dass die TCC ein weit verbreitetes Motiv in Ionenkanälen (s. 2.2.1) ist. Im Laufe dieser Arbeit durchgeführte Analysen ergaben, dass strukturell konservierte Homologe der TCC in den Familien der durch zyklische Nucleotide gesteuerten Kationenkanälen (CNG), in den spannungsabhängigen, für Kalium selektiven Kanälen (neben EAG, auch in ELK, ERG und KCNQ), in den Calcium abhängigen Kalium-Kanälen (SK, IK), in den nicht selektiven Kationenkanälen (PKD (Chen *et al.*, 1999)) und Calcium Kanälen (TRP) gefunden werden können. In den meisten Fällen ist die TCC ein durchgehender Bereich von Aminosäuren, die das Motiv der siebenfachen Wiederholung zeigen $(a-b-c-d-e-f-g)_n$. Mitglieder der KCNQ Gen-Familie sowie TRP2 und TRPC7 Kanäle zeigen eine Besonderheit: Das TCC-Motiv ist bei diesen Kanälen in eine α - und eine β -Unterdomäne (s. Abb. 3) zweigeteilt, die durch einen nicht helikalen Bereich von Aminosäuren verbunden sind und von denen die Coiled-Coil Struktur unterbrochen wird.

A

hEAG1	T L Q A T V L E V K H E L K E D I K A L N A K M T N I E K Q L S E I L R I L T	932
hEAG2	A I Q T T L Q E V K H E L K E D I Q L L S C R M T A L E K Q V A E I L K I L S	943
rERG1	D V E S R L D A L Q R Q L N R L E T R L S A D M A T V L Q L L Q R O M T L V	1078
rERG2	E I G F K L E Q L Q A Q M N R L E S R V S S D I S R I L Q L L Q H	815
rERG3	E V E Q R L D L L Q E Q L N R L E S Q M T T D I Q A I L Q L L Q K Q T T V V	1066
rELK1	E V K E K V C R L N Q E I S R L N Q E V S Q L S R E I R Q V M G L L Q A R L G	913
rELK2	R N T D T L D K L R Q A V T E L S E Q V L Q M R E G I Q S L R Q A V Q L I L V	914
rELK3	E T K Q Q I N K L N S E V T T L T Q E V S Q L G K D M R S I M Q L L E N I L S	900

B

	TCC α	
hKCNQ1	D V R D V I E Q Y S Q G H L N L M V R I K E L Q R R I D Q S I	567
hKCNQ2	D V M D V I E Q Y S A G H L D M L S R I K S L Q S R V D Q I V	565
hKCNQ3	D V K D V I E Q Y S A G H L D M L S R I K Y L Q T R I D M I F	525
hKCNQ4	D V K D V I E Q Y S A G H L D M L G R I K S L Q T R V D Q I V	587
hKCNQ5	D V K D V I E Q Y S A G H L D M L C R I K S L Q T R V D Q I L	504
	TCC β	
hKCNQ1	T I G A R L N R V E D K V T Q L D Q R L A L I T D M L H Q L L S L H G	621
hKCNQ2	S M M G R L G K V E K Q V L S M E K K L D F L V N I Y M Q R M G I	622
hKCNQ3	S M M G K F V K V E R Q V Q D M G K K L D F L V D M H M Q H M E R L Q	604
hKCNQ4	S M M G R V V K V E K Q V Q S I E H K L D L L L G F Y S R C L R S	646
hKCNQ5	S M L G R V V K V E K Q V Q S I E S K L D C L L D I V Q Q V L R K	564

C

hCNGA1	D I E E K V T R M E G S V D L L Q T R F A R L L A E Y E S M Q Q K L K Q R L T K V E K F L K	663
rCNGA2	D V Q E K L E Q L E T N M D T L Y T R F A R L L A E Y T G A Q Q K L K Q R I T V L E T K M K	643
hCNGA3	D I E E K V E Q L G S S L D T L Q T R F A R L L A E Y N A T Q M K M K Q R L S Q L E S Q V K	670

D

rSK1	<u>R</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>O</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>K</u>	455
rSK2	<u>K</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>O</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>---</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>K</u>	485
rSK3	<u>K</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>O</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>---</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>K</u>	634
hKCa4	<u>A</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>---</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>K</u>	373
rSK1	<u>A</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>L</u>	495
rSK2	<u>T</u> <u>O</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>M</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>L</u>	525
rSK3	<u>M</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>L</u>	674
hKCa4	<u>M</u> <u>H</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u>	413

E

hPKD1	<u>R</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>O</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>Q</u>	4246
hPKD2	<u>E</u> <u>F</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>M</u> <u>E</u>	870
hPKDL	<u>E</u> <u>F</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>E</u>	738
hPCL2	<u>E</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>L</u>	624
hPKDREJ	<u>A</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>Y</u>	2225

F

hTRPC1	<u>L</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>M</u> <u>O</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>L</u>	745
hTRPC4	<u>L</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>L</u>	754
hTRPC5	<u>L</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>L</u>	761
hTRPC3	<u>E</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>N</u>	841
hTRPC6	<u>E</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>S</u>	921
mChak	<u>R</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u>	1250
hMLSN1	<u>R</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>M</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>M</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>A</u>	1165
hMTR1	<u>V</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>A</u>	1124
hTRPC7	<u>K</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>R</u>	1199
rTRP2	<u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>G</u>	813

Abb. 3: Tetramere Coiled-Coil Regionen in Ionkanal bildenden Proteinen

Alignments der Primärsequenzen der TCC-Domänen von unterschiedlichen Gen-Familien: EAG, ERG, ELK (A), KCNQ (B), CNG (C), SK zusammen mit KCa4 (D), Polycystin (PKD) (E) and TRP (F) Familien. Die Domänen der KCNQ Kanäle sowie die der Calcium Kanäle TRP2 und TRPC7 sind zweiteilig (s.o.). Die ersten Buchstaben der abgekürzten Namen geben die Spezies an, aus der die Sequenz ursprünglich stammt (Mensch (h), Ratte (r) und Maus (m)). Die Nummern beziehen sich auf die letzte Aminosäure, die in der Assemblierung zu einem Coiled-Coil involviert ist. Die Positionen *a* und *d* innerhalb der siebenfachen Wiederholung (schwarze Kästen) sind hervorgehoben. Die Position, an der die siebenfache Wiederholung unterbrochen ist (Stotterer), ist mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. Der TCC- α und der TCC- β Bereich sind überstrichen. Putativ nicht helikale Bereiche sind unterstrichen.

3.2 Die TCC-Peptide

Die TCC-Domänen von EAG1, EAG2 und ERG1 wurden als Peptide synthetisiert, um die Vorhersage der Sekundärstruktur zu überprüfen.

Anhand von Mutationen des *Leucine-Zippers* GCN4, einem Transkriptionsfaktor der Hefe, der in seiner Sekundärstruktur als dimeres Coiled-Coil vorliegt, konnte gezeigt

werden, dass nach einem Austausch aller Leuzin gegen Isoleuzin innerhalb des hydrophoben Kerns dieser Struktur tetramere Coiled-Coils ausgebildet werden (Harbury *et al.*, 1993). Dieser Austausch übt also einen drastischen Einfluss auf die Multimerisierung dieser Struktur aus. Dagegen sind die Einflüsse auf die Charakteristika einer Coiled-Coil Struktur, die aus dem Austausch einer von ca. 40 Aminosäuren resultieren, weitgehend unbekannt. Als Kontrolle wurde eine hydrophobe Aminosäure an Position „a“ der siebenfachen Wiederholung durch eine polare Aminosäure (Tyrosin) ausgetauscht. Die Kontrollpeptide der TCC-Peptide werden TCC-EAG1L20Y, TCC-EAG2L13Y und TCC-ERG1L20Y (angegeben sind die Position und die ausgetauschte Aminosäure) bezeichnet.

Das Peptid TCC-ERGinsG repräsentiert die durch eine Mutation (*frame shift*) in der genomischen DNA resultierende Aminosäuresequenz der TCC-Domäne von HERG1. Von dieser Mutation ist bekannt, dass sie im Phänotyp mit dem LQT2-Syndrom einhergeht (Splawski *et al.*, 2000). Das LQT2-Syndrom ist eine angeborene Krankheit, die durch ein verlängertes QT-Intervall charakterisiert ist und zu einem plötzlichen Herztod führen kann.

Die TCC-Peptide, die Kontrollpeptide und TCC-ERGinsG (Sequenzen im Anhang A) wurden über Festphasensynthese (Merrifield, 1963) im Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin und von Biosyntan (Berlin, Deutschland) hergestellt. Zur weiteren Untersuchung der im Max-Planck-Institut hergestellten Peptide wurden diese durch eine RP-HPLC aufgereinigt. Das reine Peptid wurde von bei der Synthese anfallenden Spaltprodukten getrennt und durch Massenspektrometrie nach der Nano-Elektrospray-Methode (Wilm *et al.*, 1994) analysiert, um die Monomermasse festzustellen.

Die eingesetzten Peptide haben eine HPLC-Reinheit von >94%. In der massenspektrometrischen Kontrolle wurde das Molekulargewicht der Primärsequenz der Peptide bestätigt (nicht gezeigt).

3.3 Die Struktur der TCC-Peptide

Zur Bestimmung der Stöchiometrie der Zusammenlagerung der EAG1-Assemblierungsdomäne und der homologen Domänen der Proteine EAG2 und ERG1 wurden mit den entsprechend synthetisierten Peptiden, den Kontrollen (2.1.2) und dem Peptid TCC-ERGinsG Gelfiltrationen durchgeführt (Abb. 4 A - D). Durch Berechnung

der fraktionellen Elutionsvolumina (K_{av} , 2.2.6) von Eichproteinen (Anhang B) und deren Auftragung gegen den Logarithmus ihrer Molekulargewichte wurden die apparenten Molekulargewichte ($MW_{app.}$) der Peptide aus der Gelfiltration berechnet.

In der Gelfiltration unter nativen Bedingungen beträgt das $MW_{app.}$ des TCC-Peptids EAG1 das $4,9 \pm 0,3$ fache des berechneten Molekulargewichts des Monomers (MW_m) (Abb. 4A, schwarze Linie). Das Kontrollpeptid TCC-EAG1L20Y eluiert in vier Hauptpeaks mit dem $10,6 \pm 0,1$; $5,1 \pm 0,2$; $3,1 \pm 0,1$ und $1,5 \pm 0,1$ fachen des MW_m (Abb. 4A, graue Punkte). TCC-EAG2 eluiert mit dem $4,3 \pm 0,2$ fachen des MW_m (Abb. 3B, schwarze Linie) und das Kontrollpeptid TCC-EAG2L13Y in drei Hauptpeaks mit dem $5,9 \pm 0,1$; $2,7 \pm 0,1$ und $1,1 \pm 0,1$ fachen des MW_m (Abb. 3B, graue Punkte). TCC-ERG1 eluiert mit dem $4,4 \pm 0,2$ fachen des MW_m (Abb. 4C, schwarze Linie) und das Kontrollpeptid TCC-ERG1L20Y in zwei Hauptpeaks mit dem $4,9 \pm 0,1$ und $0,8 \pm 0,1$ fachen des MW_m . (Abb. 4C, graue Punkte).

Das Peptid TCC-ERGinsG, das die durch eine Mutation veränderte TCC-Domäne des HERG-Kanals repräsentiert, eluiert in drei Hauptpeaks, die dem $12,5 \pm 0,1$; $2,3 \pm 0,1$ und $1,3 \pm 0,1$ fachen des MW_m (Abb. 4D, schwarze Linie) entsprechen.

Unter denaturierenden Bedingungen (6 M Guanidiniumhydrochlorid-Lösung) zeigen die TCC-Peptide ein $MW_{app.}$ vom 1,5 - 1,6 fachen des MW_m (nicht gezeigt).

Gelfiltrationen werden in Abhängigkeit vom Stokes' schen Radius (Länge, der längsten Achse des Moleküls) von Proteinen durchgeführt. Eine genauere Bestimmung der Molekulargewichte der TCC-Peptid-Komplexe in Phosphat-Saline ermöglicht die Lichtstreuung (engl.: Multiangle Laser Light Scattering (MALLS)), weil in der kombinierten Lichtstreuung das Elutionsvolumen der Peptide, die Änderung des Refraktionsindex und die von der Molekülgröße abhängige Lichtstreuung in die Berechnung des Molekulargewichts eingehen. Für das Peptid TCC-EAG1 wurde ein MW von $18,8 \pm 1,3$ kDa (Abb. 4a, kleines Bild) und für TCC-ERG1 ein MW von $17,5 \pm 0,5$ kDa (Abb. 4c, kleines Bild) durch den Zimm-Plot (Kronmann *et al.*, 1960) von der ASTRA-Analyse-Software berechnet. Diese Molekulargewichte entsprechen dem 4,1 fachen (TCC-EAG1) und dem 3,9 fachen (TCC-ERG1) Molekulargewicht des Monomers und befinden sich daher in Übereinstimmung mit der Tetramerisierung der Peptide in Lösung. Eine OD_{280} war für TCC-EAG2 nicht messbar. Somit konnte das Molekulargewicht nicht berechnet werden.

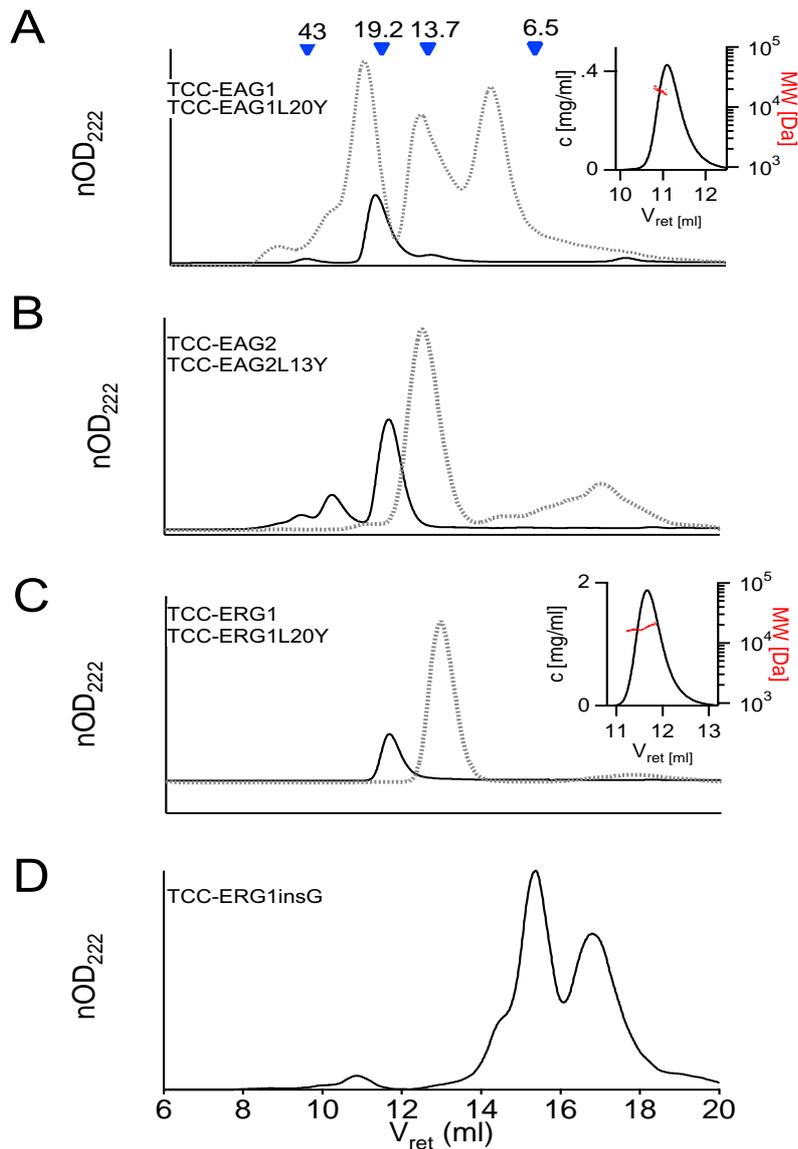


Abb. 4: Stöchiometrie der Zusammenlagerung der TCC-Peptide und der Kontrollen sowie TCC-ERGINsG

Die Gelfiltration wurde unter nativen Bedingungen durchgeführt (A-D). Die Abbildung zeigt die normalisierte optische Dichte bei 222nm (nOD_{222}) gegen das Retentionsvolumen der Peptide: **A** TCC-EAG1 (schwarz, 4591 Da), TCC-EAG1L20Y (grau, 4640 Da); **B** TCC-EAG2 (schwarz, 4462 Da), TCC-EAG2L13Y (grau, 4514 Da); **C** TCC-ERG1 (schwarz, 4467 Da), TCC-ERG1L20Y (grau, 4475 Da) und **D** TCCERGINsG (3769 Da). Die Säule wurde in Phosphat-Saline (pH 7,4) mit Molekülen von 43, 19,2, 13,7 und 6,5 kDa kalibriert. Die blauen Pfeile geben den Peak bei OD_{280} dieser Moleküle an. Die Ermittlung des apparenten Molekulargewichts durch MALLS unter nativen Bedingungen wird in den kleinen Abbildungen (A u. C) gezeigt. Die ermittelte Konzentration (linke Achse, durchgezogene Linie) und das evaluierte Molekulargewicht (rechte Achse, Punkte) sind gegen das Retentionsvolumen (V_{Ret}) aufgetragen.

3.4 Sekundärstruktur und thermische Stabilität der TCC-Domäne

Untersuchungen der Sekundärstruktur und der thermischen Stabilität der Peptide wurden mittels Zirkulardichroismus- (CD-) Spektroskopie durchgeführt. Die Peptide wurden in Trifluorethanol (TFE), Phosphatpuffer und Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (3,5 M) untersucht. Die Änderungen der Sekundärstruktur in Abhängigkeit von der Temperatur wurde als Veränderung der Elliptizität (unterschiedliche Absorption des rechts zirkularpolarisierten und des links zirkularpolarisierten Lichts) im Wellenlängenbereich von 190 nm bis 260 nm aufgezeichnet. Dabei wurden die Wellenlängen 222 nm, 208 nm und 193 nm besonders beachtet, da α -helikale Strukturen bei diesen Wellenlängen die stärkste Elliptizität im UV-Bereich besitzen. Die Messungen von TCC-Peptiden gleicher Konzentration in reinem TFE und in Phosphatpuffern ergaben keine deutlichen Unterschiede im Gehalt α -helikaler Struktur (nicht gezeigt). Eine maximale Stabilisierung der helikalen Konformation in TFE (100%) ist für Proteine gezeigt worden (Chiang *et al.*, 1996). Daher darf angenommen werden, dass die Peptide unter physiologischen Bedingungen in maximal helikaler Konformation vorliegen. Für die Bestimmung der Sekundärstruktur der TCC-Peptide und der Kontroll-Peptide wurde die molare Elliptizität im Bereich von 190 nm bis 260 nm ausgewertet.

Das Peptid TCC-ERGinsG, das die durch eine *frame shift* Mutation betroffene TCC-Domäne des HERG1-Proteins (Splawski *et al.*, 2001) darstellt, beinhaltet keine Aminosäuresequenz, die zur Ausbildung einer amphipatischen α -Helix führt. Berechnungen der Sekundärstruktur des Peptides (Abb. 5) ergaben einen α -helikalen Gehalt von 9,40% (Natriumphosphat, pH 7,4) und einen maximalen α -helikalen Gehalt von 16,7% (TFE). Die Evaluierung erfolgte durch das Programm „circular dichroism spectra deconvolution by neural networks“ (CDNN, Böhm, 1992).

Aufgrund des geringen α -helikalen Anteils an der Struktur konnte gezeigt werden, dass es sich nicht um einen Coiled-Coil (Fairman *et al.*, 1995; Fassauer *et al.*, 1997) handelt. Daher wurden keine weiteren Experimente mit diesem Peptid unter Gesichtspunkten der thermischen Stabilität mittels CD-Spektroskopie durchgeführt.

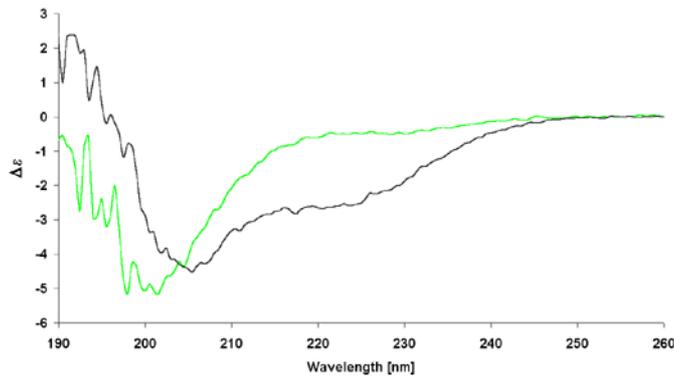


Abb. 5: TCC-ERGinsG ist kein Coiled-Coil

Messungen der molaren Elliptizität des Peptides TCC-ERGinsG (40 μ M) im Wellenlängenbereich von 190 nm – 260 nm in Natriumphosphat (10 mM, pH 7,4; grün) und in reinem TFE (~100%; schwarz) bei 20°C.

Die CD-Spektren der untersuchten Peptide in temperaturabhängigen (0°C – 90°C) Messungen (190 nm bis 260 nm) zeigen, dass alle Peptide unter physiologischen Bedingungen vorherrschend in α -helikaler Struktur vorliegen. Die Spektren der Peptide zeigen bei allen gemessenen Temperaturen einen gemeinsamen Schnittpunkt, was darauf schließen lässt, dass sich alle Spektren aus den Einzelspektren von nur zwei unterschiedlichen Strukturen zusammensetzen - einer nativen und einer denaturierten Struktur. Das ebenfalls zwischen 0°C und 90°C aufgenommene CD-Spektrum des Peptids TCC-EAG1 (Abb. 6A) zeigt diesen gemeinsamen Schnittpunkt nicht. Das Peptid hat eine maximal helikale Struktur von 83,4% bei 40°C. Sowohl bei abnehmender, als auch bei zunehmender Temperatur nimmt der α -helikale Anteil ab. Er beträgt 67% bei 0°C und 14% bei 90°C. Bei Temperaturen zwischen 50°C und 90°C haben die CD-Spektren des TCC-EAG1 Peptids wiederum nur einen gemeinsamen Schnittpunkt (s.o.). TCC-EAG2 und TCC-ERG1 liegen in maximal helikaler Konformation bei 0°C vor (76% und 91%). Die Spektren dieser Peptide zeigen jeweils einen gemeinsamen Schnittpunkt, der bei 204 nm liegt. Die Kontrollpeptide zeigen diesen Schnittpunkt ebenfalls, doch ist der helikale Anteil an der Gesamtstruktur deutlich geringer als der des jeweils entsprechenden TCC-Peptids (s. Abb. 6). Der Austausch einer Aminosäure in der Sequenz des TCC-Peptids EAG1 äußert sich bei der Messung des Kontrollpeptids TCC-EAG1L20Y in einem Verlust von 26,4% α -helikalen Anteils an der Gesamtstruktur im Vergleich zu dem TCC-EAG1 Peptid. Das Peptid TCC-EAG1L20Y liegt in einer maximal helikalen Konformation von 57% bei 0°C und im denaturierten Zustand von 13,9% bei 90°C vor. Die Eigenschaft der Zunahme an α -Helizität im Temperaturbereich von 0°C bis 40°C zeigt dieses Peptid nicht. Die Kontrollpeptide TCC-EAG2L13Y und TCC-ERG1L20Y haben eine maximal helikale Struktur von

54,8% und 87,9% bei 0°C. Bei 90°C ist ein helikaler Anteil von 13,2% (TCC-EAG2L13Y) und 13,4% (TCC-ERG1L20Y) zu berechnen.

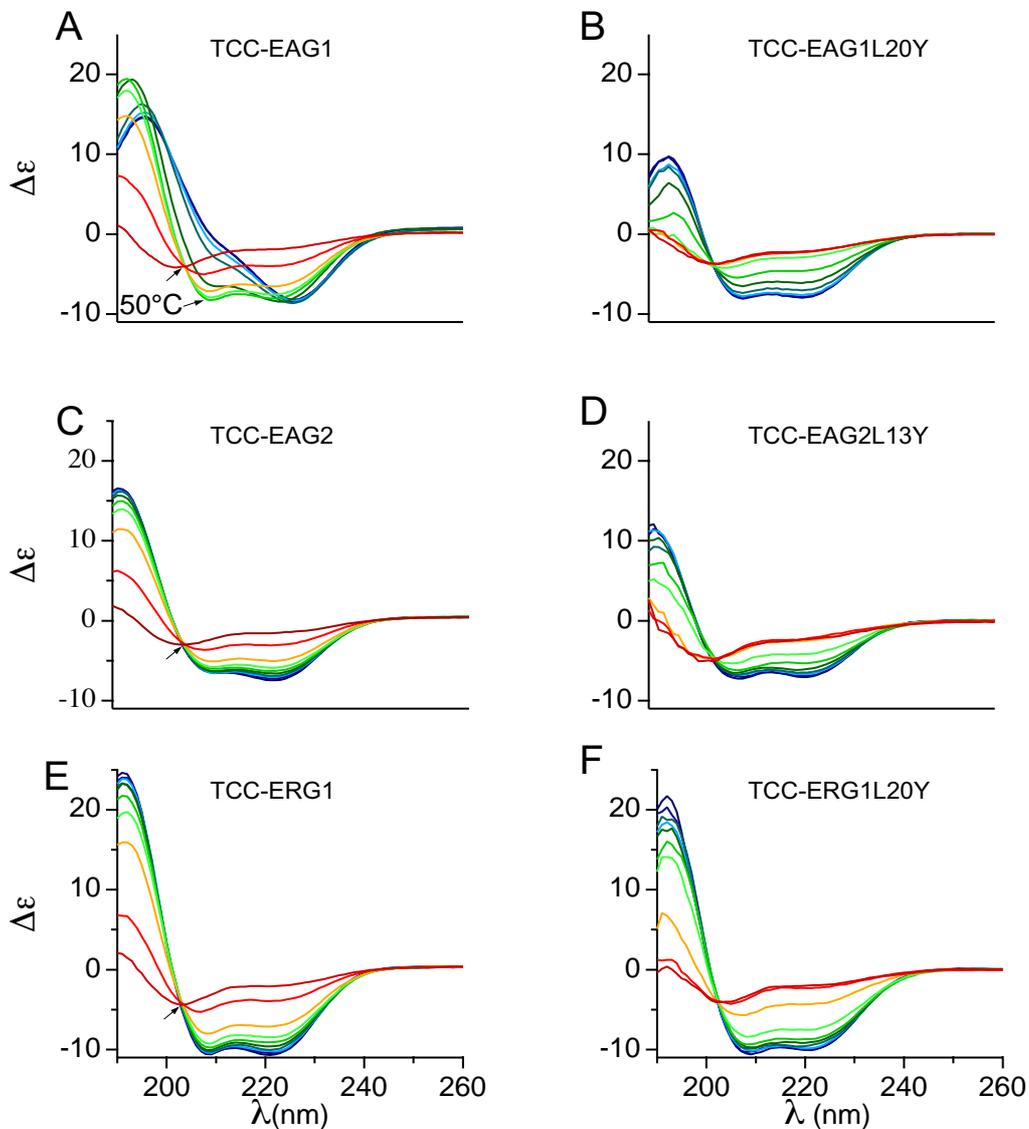


Abb. 6: Temperaturabhängige Messung der molaren Elliptizität der TCC-Peptide und der Kontrollen in Natriumphosphat (10 mM, pH 7,4)

Die Hitzedenaturierung der Peptide TCC-EAG1 (A, 13,1 μM), TCC-EAG1L20Y (B, 30 μM), TCC-EAG2 (C, 7 μM), TCC-EAG2L13Y (D, 13 μM), TCC-ERG1 (E, 8 μM), TCC-ERG1L20Y (F, 30 μM) wurde in einem Wellenlängenbereich von 190 nm bis 260 nm und einer Temperatur von 0°C bis 90°C bei einer Auflösung von 1 nm durchgeführt. Die Daten wurden aus zehn einzelnen Messungen gemittelt und jeder Datenpunkt für 8 s gemessen. Die Temperatur wurde um 2°C / min erhöht.

grün: 0°C, 10°C, 20°C, 30°C, **blau:** 40°C, 50°C, 60°C, **rot:** 70°C, 80°C, 90°C

In Abb. 7 wird der Einfluss des Austausches einer hydrophoben Aminosäure von Position „a“ durch eine polare Aminosäure (Tyrosin) aus dem Motiv der siebenfachen Wiederholung auf den prozentualen helikalen Gehalt an der gesamten Sekundärstruktur während einer temperaturabhängigen Denaturierung gezeigt. Die TCC-Peptide zeigen einen deutlich höheren Gehalt an α -helikalem Anteil an der Sekundärstruktur bei entsprechender Temperatur im Vergleich zu den Kontrollpeptiden.

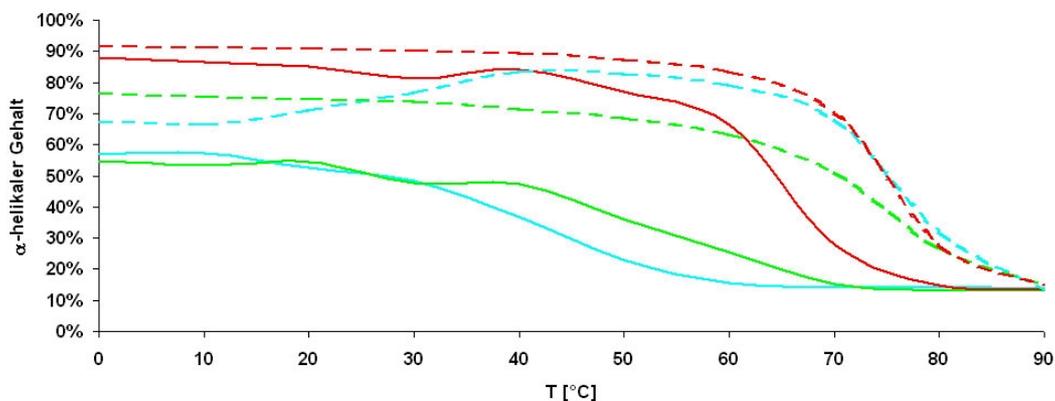


Abb. 7: Vergleich des α -helikalen Gehaltes der TCC- und der Kontrollpeptide aus der temperaturabhängigen Messung der molaren Elliptizität in Phosphatpuffer

Der α -helikale Gehalt der TCC-Peptide (gestrichelte Linie) und der Kontrollpeptide (durchgezogene Linie) wurde mit CDNN aus den Daten der CD-Spektroskopie, die über den Wellenlängenbereich von 190 nm bis 260 nm aufgenommen wurden, berechnet. Jedes der aufgenommenen CD-Spektren wurde von CDNN mit 22 Referenzspektren verglichen (Böhm, 1992). TCC-EAG1, TCC-EAG1L20Y (blau); TCC-EAG2, TCC-EAG2L13Y (grün); TCC-ERG1, TCC-ERG1L20Y (rot)

Um die Stabilität der TCC-Peptide und der Kontroll-Peptide gegenüber temperaturabhängiger Denaturierung zu untersuchen, wurden in einem weiteren Versuch Schmelzkurven bei 222 nm ($\Delta\Delta\epsilon_{222\text{nm}}/\Delta T$) aufgenommen. Die Änderung der molaren Elliptizität der Peptide in diesem Experiment wurde in Phosphatpuffer (2.1.6.2) untersucht. Im Falle der TCC-Peptide wurde der Versuch auch in Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (3,5 M) durchgeführt. Die Änderung der molaren Elliptizität der Peptide wurde dazu in einem mit 3°C pro Minute ansteigenden (0°C bis 90°C) und absteigenden (90°C bis 0°C) Temperaturgradienten gemessen.

Die Peptide TCC-EAG1 (Abb. 8A), TCC-EAG2 (Abb. 8C) und TCC-ERG1 (Abb. 8E) zeigen in Phosphatpuffer keine vollständige Denaturierung. Das Peptid TCC-EAG1 (Abb. 8A, schwarz) durchläuft bei 40°C ein Maximum an $\Delta\epsilon_{222\text{nm}}$. Die Peptide renaturieren im absteigenden Temperaturgradienten beinahe vollständig. Die Kontrollpeptide TCC-EAG1L20Y (Abb. 8B, schwarz), TCC-EAG2L13Y (Abb. 8D, schwarz) und TCC-ERG1L20Y (Abb. 8F, schwarz) zeigen eine vollständige Denaturierung in Phosphatpuffer. Auch sie renaturieren fast vollständig im absteigenden Temperaturgradienten. Die in Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (3,5 M) aufgenommenen Schmelzkurven der TCC-Peptide zeigen eine vollständige Denaturierung, d.h., die Funktion $\Delta\Delta\epsilon_{222\text{nm}}/\Delta T$ erreicht unterhalb von 90°C ein Maximum. Die Peptide, mit Ausnahme des TCC-ERG1 Peptids, haben bei 0°C in Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (3,5 M) einen höheren $\Delta\epsilon_{222\text{nm}}$ -Wert als in Phosphatpuffer. Das Phänomen der Stabilisierung helikaler Strukturen in Guanidiniumhydrochlorid-Lösungen ist auch für andere Peptide bekannt (Chiang *et al.*, 1996). Die Peptide TCC-EAG1 (Abb. 8A), TCC-EAG2 (Abb. 8C) und TCC-ERG1 (Abb. 8E) zeigen keine weitere Abnahme des helikalen Anteils an der Sekundärstruktur bei Temperaturen zwischen 80°C und 90°C. Die beiden Peptide TCC-EAG1 und TCC-EAG2 weisen bei einer Sequenzähnlichkeit von 85% und einer identischen Sequenz von 64% vergleichbare Denaturierungskurven (Abb. 8 A und C) unter Hitzeeinwirkung auf. In Phosphatpuffer liegen die Peptide bei einer Denaturierungsphase von 0°C bis 90°C bei einer Temperatur von 83°C halbdenaturiert vor. Die Kontrollpeptide TCC-EAG1L20Y und TCC-EAG2L13Y liegen schon bei 50°C, respektive 60°C halbdenaturiert vor. Der gleiche Versuch in Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (3,5 M) zeigt geringe Unterschiede zwischen den TCC-Peptiden EAG1 und EAG2 (Abb. 8 A und C). Das Peptid TCC-EAG1 liegt in der De-

naturierungsphase bei 75°C und TCC-EAG2 bei 73,5°C halbdenaturiert vor. Das Peptid TCC-ERG1 liegt in der Denaturierungsphase in Phosphatpuffer bei einer Temperatur von 82°C (TCC-ERG1L20Y 68°C) halbdenaturiert vor. In Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (3,5 M) wird für TCC-ERG1 ein Schmelzpunkt von 63°C gemessen.

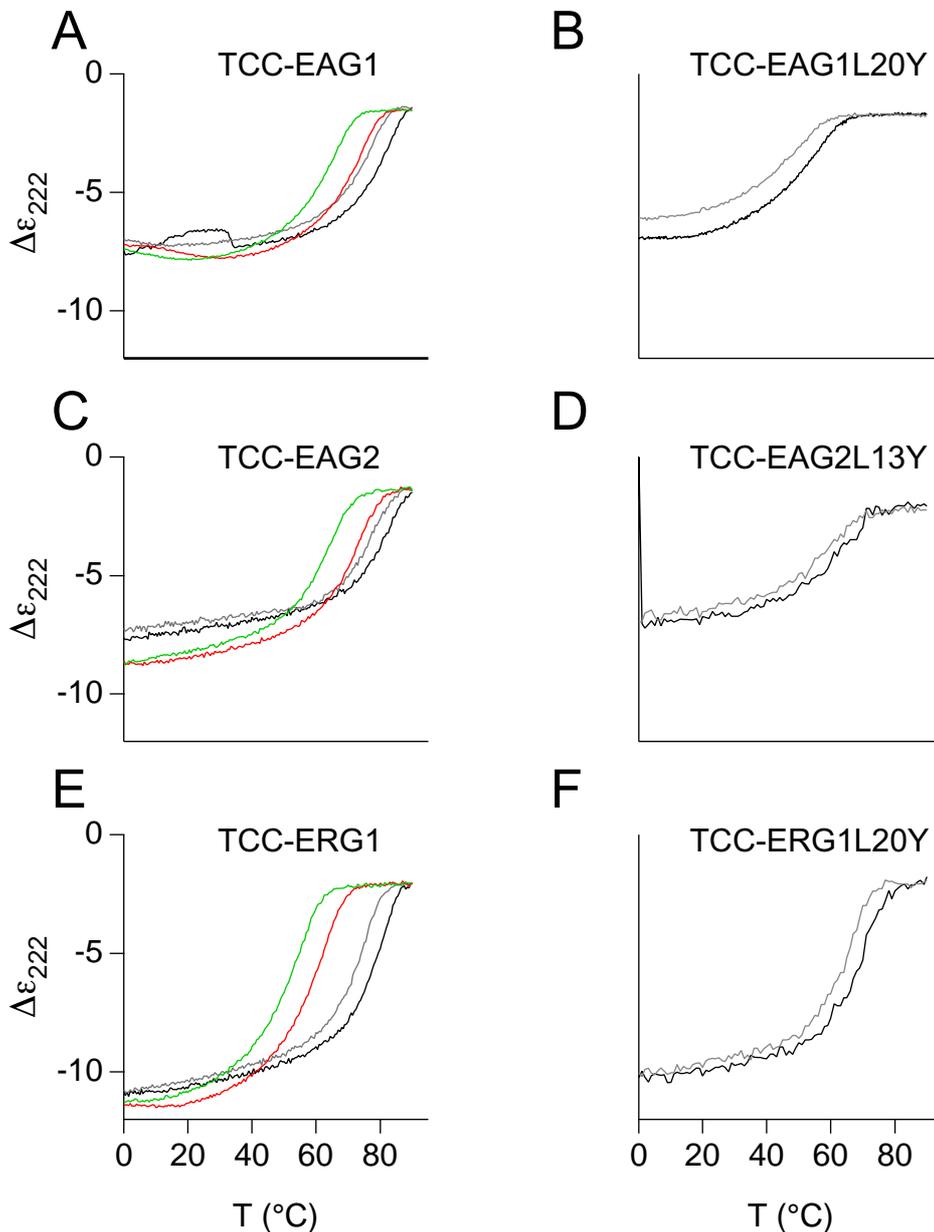


Abb. 8: Schmelzkurven der TCC-Peptide und der Kontrollpeptide in Natriumphosphat (10mM, pH 7,4)

Gezeigt wird die Änderung der molaren Elliptizität bei 222 nm ($\Delta\epsilon_{222}$) der Peptide TCC-EAG1 (**A**, 13,1 μM); TCC-EAG1L20Y (**B**, 30 μM); TCC-EAG2 (**C**, 7 μM); TCC-EAG2L13Y (**D**, 13 μM); TCC-ERG1 (**E**, 8 μM); TCC-ERG1L20Y (**F**, 30 μM). Die Messungen wurden mit einer

Auflösung von 1 nm durchgeführt und jeder Datenpunkt für 5 s gemessen. Die in Natriumphosphat (10 mM, pH 7,4) durchgeführte Messung der Denaturierung im ansteigenden Temperaturgradienten (schwarz) und die Renaturierung im absteigenden Temperaturgradienten (grau) wurden jeweils zwischen 0°C und 90°C durchgeführt. Die Temperatur wurde jeweils mit 3°C / min geändert. Die Denaturierungsphase in Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (3,5 M) ist in rot, die Renaturierungsphase in grün dargestellt.

3.5 Peptidinteraktionen: Messungen mit Oberflächen-Plasmonresonanz-Technologie

Für die Bestimmung der Kinetik und der Spezifität der Peptidinteraktion wurden auf einem CM5-Chip (Biacore, Schweden) zwischen 190 bis 320 Resonanz-Einheiten (RU) Peptid immobilisiert (Tab. 1).

Tabelle 1: Immobilisierung der TCC- und Kontrollpeptide auf dem Sensorchip CM5

Die Immobilisierung der Peptide auf einem CM5-Chip erfolgte nach einer EDC / NHS Aktivierung der Dextran-Matrix bei einem Pufferfluss (HBS) von 10 μl / min. Die Menge immobilisierten Peptids in Resonanzeinheiten (RU) wurde nach der Kopplung und der Deaktivierung des Chips sowie einer zweiminütigen Denaturierung mit Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (6 M) gemessen. Die Zunahme von einer Resonanzeinheit entspricht einem Picogramm immobilisierten Peptids.

Peptid	Volumen [μl]	Konz. [μM]	Acetatpuffer	RU
TCC-EAG1	50,0	1,3	pH 4,5	250
TCC-EAG1L20Y	40,0	3,1	pH 4,5	235
TCC-EAG2	50,0	2,1	pH 4,5	222
TCC-EAG2L13Y	50,0	2,6	pH 4,5	197
TCC-ERG1	150,5	3,2	pH 4,0	219
TCC-ERG1L20Y	40,0	3,3	pH 4,5	294
TCC-ERGsG	50,0	4,0	pH 4,0	320

Nach der in der Oberflächen-Plasmonresonanz Technologie üblichen Nomenklatur werden die auf den Sensorchips immobilisierten Interaktionspartner als Liganden, die in Lösung befindlichen Reaktionspartner als Analyten bezeichnet. Die aufgenommenen Sensogramme zeigen in der Assoziations- und Dissoziationsphase deutliche Unterschiede der Geschwindigkeit und Spezifität der Peptidinteraktionen. Der Begriff der Geschwindigkeit ist im folgenden in Bezug zur Datenaufnahmerate von 1 Hz zu verstehen. Demnach liegt der Wert einer schnellen Interaktionsrate oberhalb oder im Bereich der Datenaufnahmefrequenz und der einer langsamen Interaktion deutlich unterhalb der Datenaufnahmefrequenz, so dass viele Messpunkte den Verlauf der Assoziation und der Dissoziation zeigen.

Die Analyten wurden vor der Interaktionsmessung im Laufpuffer äquilibriert, so dass eine Interaktion zwischen Tetrameren (Analyten) und auf dem Sensorchip immobilisierten TCC-Peptiden (Liganden) gemessen wurde. Die Liganden wurden durch eine 2 min Kontaktzeit mit Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (6 M) denaturiert und dadurch monomerisiert. Es kommt zu einer Konkurrenz zwischen den Mono-, Di-, Tri- und Tetrameren in der Lösung um die immobilisierten Monomere. Daher ist die gemessene Interaktion keine eins zu eins Bindung.

Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde jede Interaktionsmessung pro Peptidkonzentration dreimal wiederholt. An der genauen Überlagerung der Sensogramme der entsprechenden Konzentration ist erkennbar, dass die Reäquilibrierung der Chipoberfläche mit Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (6 M) eine Reduzierung der RU auf das Ausgangsniveau der Immobilisierung bewirkt. Vorversuche ergaben, dass eine Reäquilibrierung der Chipoberfläche weder mit Glycin (pH 1,5 – 3), noch durch SDS (0,1% - 0,5%) erreicht werden konnte (nicht gezeigt).

Die exakte Überlagerung ist sowohl bei der homologen Interaktion von TCC-EAG1 (Abb. 9 1/A) als auch bei der heterologen Interaktion mit dem Analyten TCC-EAG2 (Abb. 9 1/B) zu erkennen.

Die homologe Interaktion von TCC-EAG1 (Abb. 9 1/A) ist durch eine kontinuierliche Zunahme von RU und eine langsame Dissoziation gekennzeichnet. Die heterologe Interaktion von gebundenem TCC-EAG1 mit TCC-EAG2 (Abb. 9 1/B) an der Dextranmatrix zeigt eine im Vergleich zur homologen TCC-EAG1 Interaktion (Abb. 9 1/A) eine schnellere Assoziation und Dissoziation. Dieses Ergebnis kann auch bei einem Austausch der Interaktionspartner gezeigt werden, denn auch die heterologe Interaktion des Liganden TCC-EAG2 mit TCC-EAG1 (Abb. 9 2/A) zeigt eine schnellere Assoziations- und Dissoziationsphase als die homologe Interaktion von TCC-EAG2 (Abb. 9 2/B). Die Peptide TCC-EAG1 und TCC-EAG2 binden nicht an TCC-ERG1 (Abb. 9 A/3 und B/3).

Das Peptid TCC-ERG1 zeigt weder mit TCC-EAG1 (Abb. 9 3/A) noch mit TCC-EAG2 (Abb. 9 3/B) eine langsame Assoziation bzw. Dissoziation. Die homologe Interaktion von TCC-ERG1 (Abb. 9 3/C) zeigt bei einer Peptid-Konzentration von 3 μM eine Zunahme von 60 RU.

Die Kinetik der Interaktion ist der zuvor bei den homologen Interaktionen von TCC-EAG1 und TCC-EAG2 beobachteten ähnlich. Die Dissoziation der homologen Inter-

aktion des Peptids TCC-ERG1 ist jedoch in den ersten 2 min schneller als die der TCC-EAG Peptide.

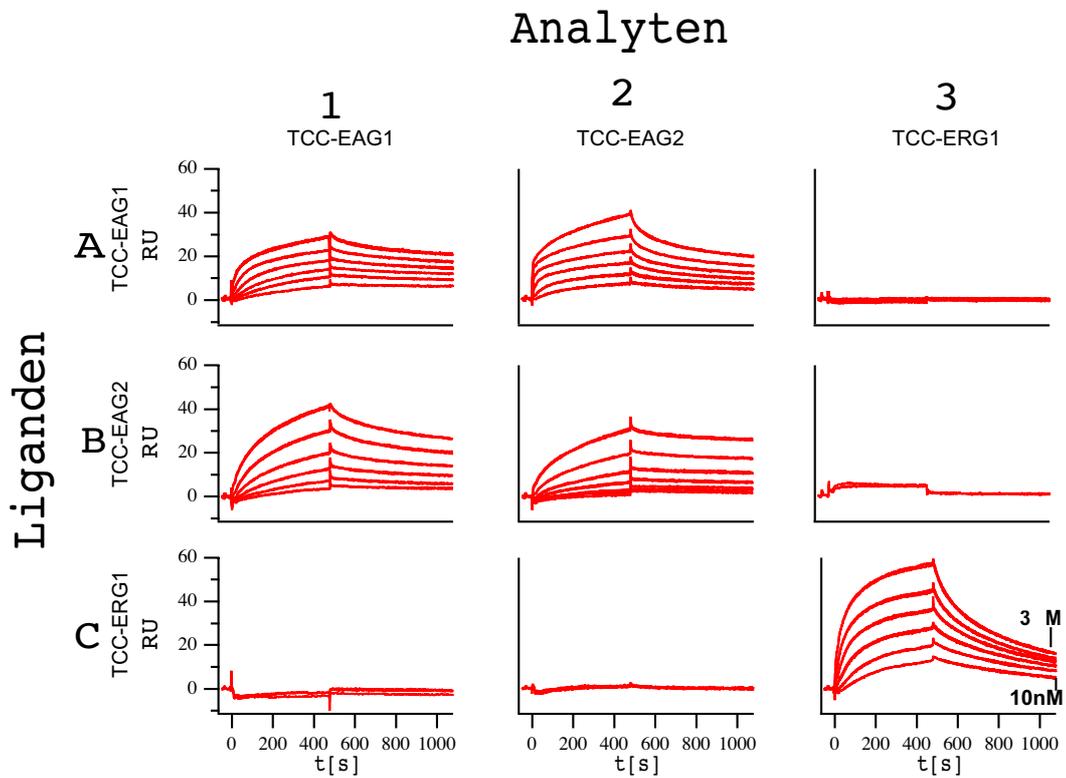


Abb. 9: Die Interaktionen der TCC-Peptide

Gezeigt wird die homologe und die heterologe Interaktion der TCC-Peptide. Die Liganden sind **A** TCC-EAG1, **B** TCC-EAG2, **C** TCC-ERG1 und die Analyten **1** TCC-EAG1, **2** TCC-EAG2, **3** TCC-ERG1. Jede Konzentration (10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 μ M) wurde bei einer Flussrate von 20 μ l / min und einer Reaktionstemperatur von 25°C dreimal nacheinander gemessen. Die Assoziationsphase betrug 480 s, die Dissoziationsphase 600 s. Vor jeder Interaktionsmessung wurde der jeweilige Ligand mit Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (6 M, 2 min) denaturiert. Die Peptidlösungen wurden bis zur Reaktion in HBS-Puffer bei 4°C gelagert.

Die Interaktionen der immobilisierten TCC-Peptide mit den Kontrollpeptiden als Analyten (Abb. 10) sind vor allem durch eine raschere Dissoziation nach einer Kontaktzeit von 480 s gekennzeichnet. Das Kontrollpeptid TCC-EAG1L20Y zeigt eine ähnliche Assoziationsphase (Abb. 10A, grau) im Vergleich zu der homologen Interaktion des TCC-Peptids EAG1 (Abb. 10A, schwarz). Im kontinuierlichen Pufferfluss dissoziiert es jedoch spontan. Die Interaktion des Kontrollpeptids TCC-EAG2L13Y mit dem TCC-EAG2 Peptid ist jeweils durch eine schnellere Assoziations- und Dissoziations-Phase gekennzeichnet (Abb. 10B, grau), als es bei der homomeren Interaktion von TCC-EAG2 zu messen ist. Die Assoziationsphase von TCC-ERG1L20Y als Analyt in Interaktion mit TCC-ERG1 zeigt einen spontanen Anstieg der Resonanzeinheiten auf einen maximalen Wert (Abb. 10C, grau). Dieses Equilibrium wird bei der homologen Interaktion des TCC-ERG1 Peptids während der Assoziationsphase von 480 s nicht erreicht (Abb. 10C, schwarz). Die Dissoziationsphase der Interaktion von TCC-ERG1L20Y und TCC-ERG1 ist von einem Verlust von über 50% der Resonanzeinheiten innerhalb der ersten Sekunde gekennzeichnet. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Spezifität und Stabilität der Interaktion durch einen Austausch von einer aus ca. 40 Aminosäuren drastisch verändert werden.

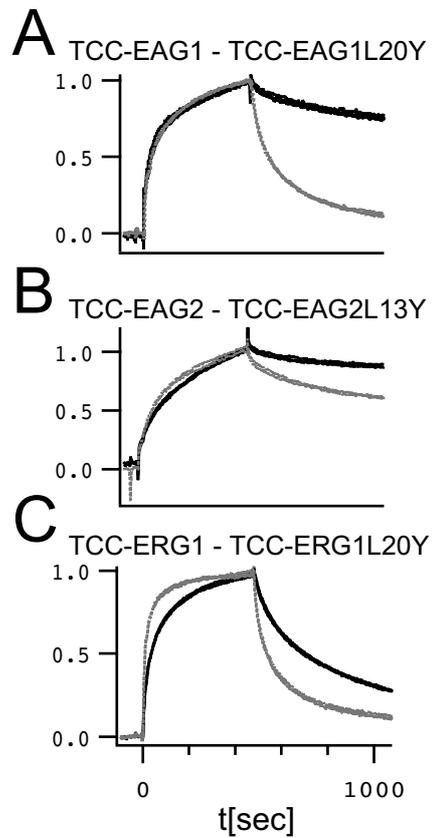


Abb. 10: Vergleich der Interaktion der TCC-Peptide mit den Kontrollpeptiden

Normalisierte Darstellung der homologen Interaktion der TCC-Peptide (**A** EAG1, **B** EAG2, **C** ERG1, schwarz) und der Interaktion mit dem jeweiligen Kontrollpeptid als Analyt (**A** TCC-EAG1L20Y, **B** TCC-EAG2L13Y, **C** TCC-ERG1L20Y, grau). Gezeigt wird die Interaktionsmessung bei einer Konzentration von $3\mu\text{M}$.

Die Interaktion von TCC-ERGinsG mit TCC-ERG1 (jeweils als Analyt und Ligand; Abb. 11) ergab, dass dieses Peptid neben dem Verlust der tetrameren Stöchiometrie (s. Abb. 4) und dem niedrigen helikalen Gehalt der Sekundärstruktur (s. Abb. 5) weder eine homomere, noch eine heteromere Interaktion mit dem jeweils immobilisierten Interaktionspartner zeigt. Somit hat die *frame shift* Mutation im C-Terminus von HERG1 (Splawski *et al.*, 2000) eine weitreichendere Auswirkungen auf die Funktionalität der TCC-Domäne, als der Austausch einer aus 40 Aminosäuren bei den Kontrollpeptiden.

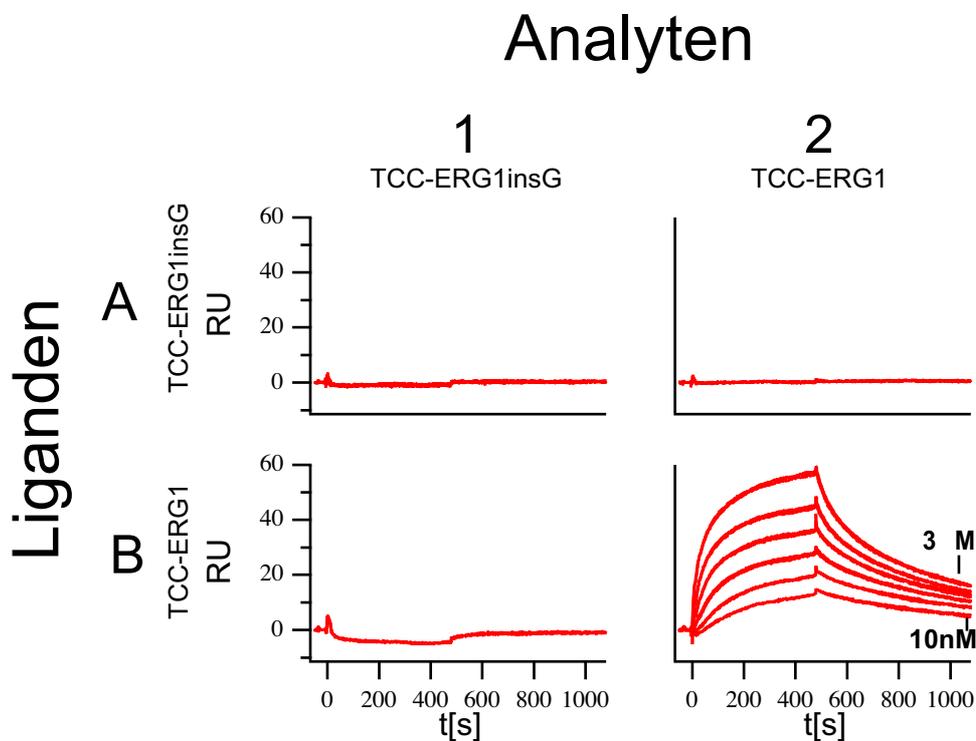


Abb. 11: Messung der Interaktion des TCC-Peptids ERG1 und TCCERGinsG

Die homologe und die heterologe Interaktion zwischen den Peptiden TCC-ERG1 und TCC-ERGinsG werden gezeigt. Das Peptid TCC-ERGinsG verliert die Fähigkeit, Homomere bzw. Heteromere auszubilden. Der experimentelle Ablauf entspricht dem der vorangegangenen Messungen (s. Bildunterschrift Abb. 9).

3.6 Die Rolle der TCC-Domäne in der Assemblierung von α -Untereinheiten und in der Ausbildung funktioneller Kanäle

Die zuvor gezeigten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die selektive Tetramerisierung der α -Untereinheiten zu dem Ionenkanal auch von der Funktionalität der TCC-Domäne ableitbar ist. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde ein HERG-Kanal mit einer Mutation hergestellt - HERG-TCCERGinsG. Diese Mutation mit einer Deletion an Position 3094 kommt natürlich vor (Splawski *et al.*, 2000) und verursacht neun Aminosäuren vor der TCC-Domäne des HERG-Kanals eine Leserasterverschiebung (*frame shift* Mutation). Die Mutation hat zur Folge, dass die resultierende Aminosäuresequenz in computergestützten Analysen mit dem Programm Coils (Version 2.2) keine Coiled-Coil Struktur ausbildet. Das entsprechende Peptid TCC-ERGinsG bildet keine Tetramere (Abb. 4), sein α -helikaler Gehalt (Abb. 5) ist nicht vergleichbar mit dem α -helikalen Strukturanteilen von Coiled-Coils (Abb. 6) und eine Interaktion zwischen den Peptiden TCC-ERGinsG und TCC-ERG1 war mit Oberflächen-Plasmonresonanz-Technologie nicht messbar.

Die funktionellen Eigenschaften des rekombinant expremierten Ionenkanals HERG-TCCERGinsG (HERG1 – Kanalkonstrukt (AnhangC)), entsprechend der von Splawski *et al.*, 2000 beschriebenen Mutante) wurden in *Xenopus* Oozyten mit der „Zwei-Elektroden-Spannungsklemm“ (TEVC) Technik untersucht. Während der Untersuchung konnten keine Ströme gemessen werden (Abb. 12 A). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass dieses Kanalkonstrukt ohne TCC-Domäne nicht zu funktionellen Ionenkanälen assemblieren kann.

Um die Frage zu beantworten, ob sich die Funktionalität dieses Kanals durch Einfügen einer TCC-Domäne wiederherstellen lässt, wurde ein chimäres Protein aus HERG-TCCERGinsG mit der TCC-Domäne aus EAG1 (HERG-TCCEAG1, Anhang C) hergestellt. Die für dieses Konstrukt kodierende RNA wurde in Oozyten injiziert und mit der TEVC-Technik untersucht. Die gemessenen Ströme sind in Abbildung 12 B dargestellt. Sie zeigen eine sehr schnelle Inaktivierung nach dem Öffnen des Ionenkanals. Diese Eigenschaft ist vergleichbar, mit der eines funktionellen HERG-Wildtyp Kanals (Abb. 12 C).

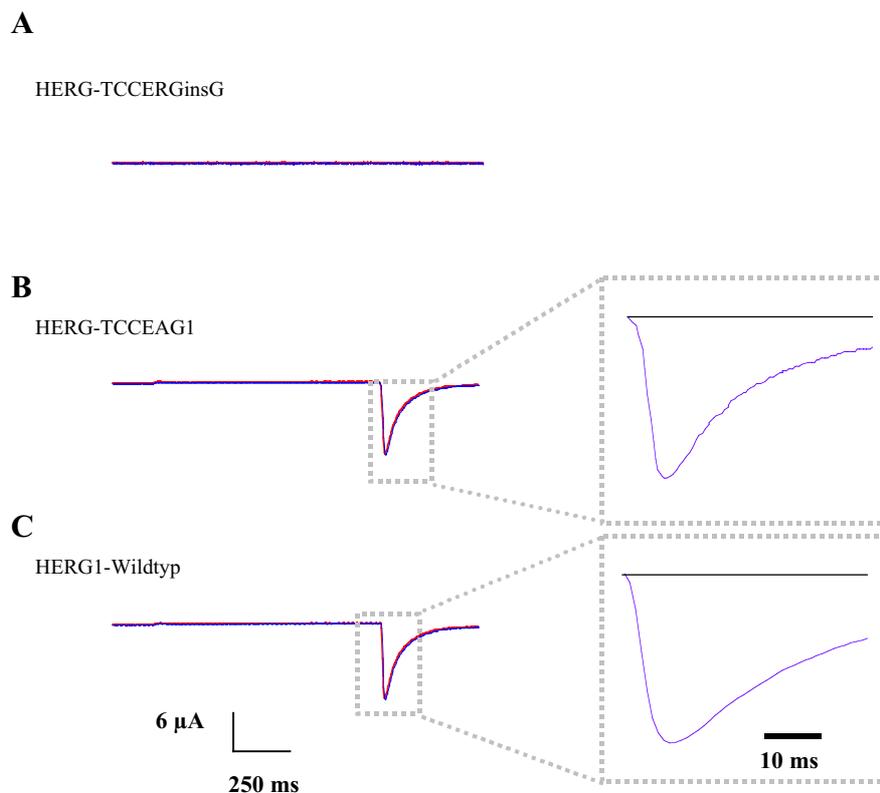


Abb. 12: Wiederherstellung der Funktionalität eines mutierten HERG-Kanals durch Einfügung der TCC-Domäne des EAG1-Kanals

Die Zerstörung des Motivs der TCC-Domäne in HERG1 durch eine Mutation (TCC-ERGinsG) führt zu der Expression eines nicht funktionellen Kanals. Die Funktionalität kann durch das Einfügen der TCC-Domäne aus hEAG1 wieder hergestellt werden. Messung **A** HERG-TCCERGinsG, **B** Messung des Kanalkonstrukts HERG-TCCEAG1 und **C** Messung HERG1-Wildtyp.

Um sicherzustellen, dass die zuvor gezeigten Ergebnisse mit in der Membran integrierten Ionenkanälen durchgeführt wurden, wurden die Konstrukte N-terminal mit dem „grünfluoreszierendem Protein“ (GFP) in Zellen aus Chinesischen Hamster Ovarien (CHO-Zellen) transient exprimiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 13).

Die Bilder von der transienten Expression von GFP-ERG1 Wildtyp und GFP-ERGIns in CHO-Zellen zeigen eine vergleichbare Verteilung der Fluoreszenz. Der Hauptteil an Protein liegt intrazellulär vor. Daher kann angenommen werden, dass keine drastischen Unterschiede in der Verteilungen der Proteine in der Membran vorliegen.

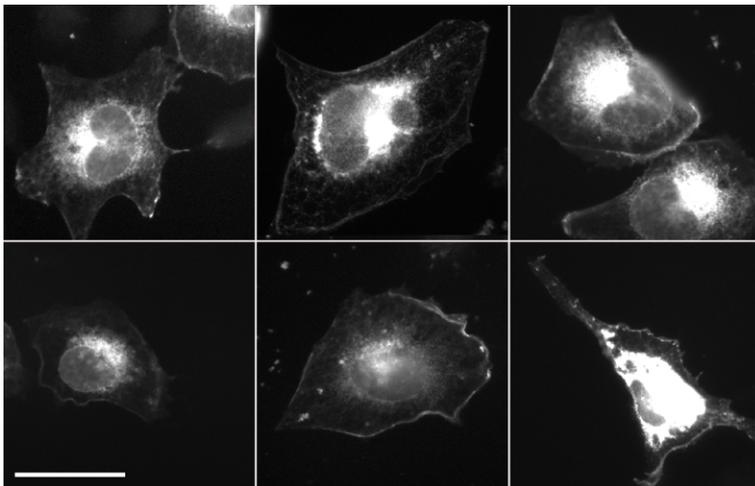


Abb. 13: Verteilung der Fluoreszenz der GFP markierten Kanalkonstrukte

GFP-ERG1 Wildtyp (oben) und GFP-ERGIns (unten) wurden in CHO-Zellen transient exprimiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Kanalkonstrukte zeigen eine vergleichbare Verteilung und Menge der Fluoreszenz in der Plasmamembran und intrazellulär. Der Balken entspricht einer Länge von 25µm.

Ist die TCC-Domäne verantwortlich für die Spezifität der Assemblierung von α -Untereinheiten zu funktionellen Ionenkanälen? Diese Frage stellt sich aus den Ergebnissen der mit Oberflächen-Plasmonresonanz-Technologie durchgeführten Interaktionsmessungen zwischen TCC-Peptiden (Abb. 9). Zu ihrer Beantwortung wurde das HERG-TCCEAG1 Kanalkonstrukt zusammen mit dem EAG1-Kanal (Anhang C) in

Xenopus Oozyten exprimiert. EAG1- und HERG-Kanäle bilden normalerweise keine funktionellen heteromeren Kanäle aus (Wimmers *et al.*, 2001). Die Ströme, die nach der Expression dieser beiden Kanäle in einer Oozyte gemessen wurden, können durch eine lineare Addition der Ströme beschrieben werden, die durch eine unabhängige homologe Expression jedes Kanals in einer Oozyte erhalten werden (Abb. 14 D). Die gemessenen Ströme sind daher nur das Resultat einer Messung von zwei unabhängigen Ionenkanalpopulationen, die in einer Oozyte gemessen wurden.

Obwohl EAG1 und HERG Kanäle Mitglieder der EAG-Superfamilie sind, zeigen sie in TEVC-Experimenten unterschiedliche Eigenschaften. Für EAG1 charakteristisch ist die Abhängigkeit der Aktivierung von dem zuvor angelegten Potential vor dem Stimulus (Abb. 14 A) (Ludwig *et al.*, 1994). HERG-Kanäle sind durch eine sehr schnelle Inaktivierung während des Öffnens des Ionenkanals charakterisiert, die durch die Depolarisation hervorgerufen wird. Daher sind keine auswärtsgerichteten Ströme messbar. Nachdem das Membranpotential den Ausgangswert der Hyperpolarisation (-120 mV) wieder erreicht hat, werden einwärtsgerichtete Ströme messbar (Abb. 14 B). Der Kanal ist nicht mehr inaktiviert und Kalium gelangt in die Zelle. Die Wahrscheinlichkeit für einen geschlossenen Zustand (Deaktivierung) ist für die Ionenkanäle bei einem Potential von -120 mV sehr hoch. Die Deaktivierung verläuft gegenüber der Aufhebung der Inaktivierung langsamer. Die aus der Co-Expression des HERG-TCCEAG1 Kanalkonstrukts mit dem EAG1-Wildtyp Kanal in einer Oozyte resultierenden Ströme (Abb. 14 C) weichen deutlich sowohl von der Co-Expression von EAG1-Wildtyp und HERG1-Wildtyp ab (Abb. 14 D), als auch von der theoretischen linearen Addition der Messungen der homologen Expression dieser beiden Kanäle (Abb. 14 D, oberes Bild). Ein Kanal mit neuen Eigenschaften ist entstanden. Dieser Kanal zeigt eine schnellere Kinetik der Aktivierung nach erfolgter Hyperpolarisation von -140 mV im Vergleich zu der des EAG1-Wildtyps. Gleichzeitig ist auch eine schnellere Kinetik der Deaktivierung im Vergleich zu HERG1-Wildtyp zu beobachten (Abb. 14 C).

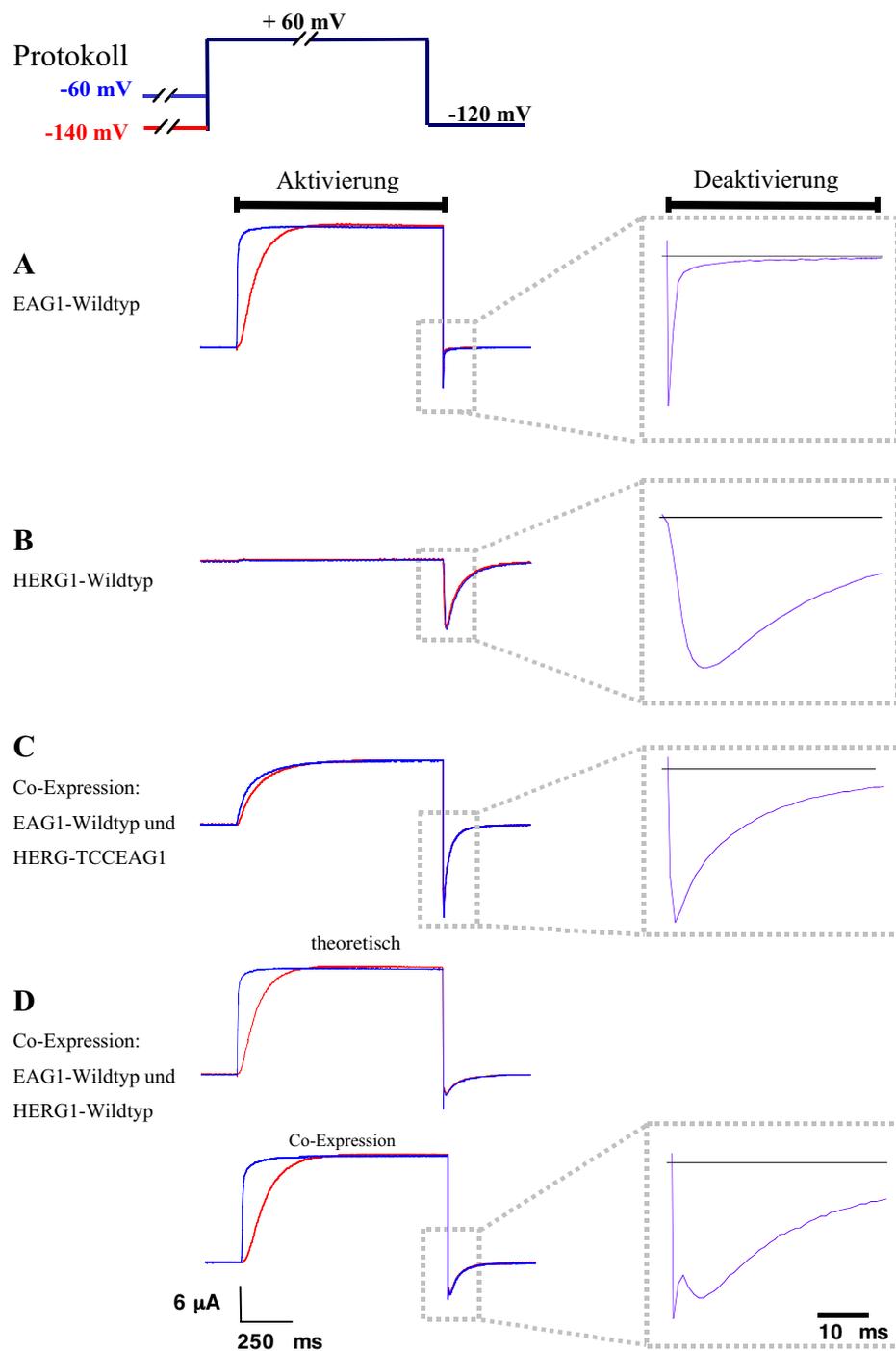


Abb. 14: Heteromere Interaktion zwischen EAG1-Wildtyp und HERG1:EAG1TCC

Die in Oozyten gemessenen Ströme der jeweiligen Expression von **A** EAG1-Wildtyp, **B** HERG1-Wildtyp und **C** der Co-Expression von EAG1-Wildtyp zusammen mit HERG-TCCEAG1 sind dargestellt. In **D** wird eine Co-Expression von EAG1-Wildtyp und HERG1-Wildtyp gemessen und eine Interaktion zwischen EAG1-Wildtyp und HERG1-Wildtyp durch lineare Addition simuliert (oberes Bild). Für die Messung wurde ein Protokoll erstellt (s. Pro-

tokoll), das die funktionellen Eigenschaften von EAG1 und HERG1 betont. Ein langer Präkonditionierungs-Puls (5 s) von -140 mV (rote Linie) bzw. -60 mV (blaue Linie), gefolgt von einem Depolarisations-Puls von $+60$ mV für 1 s und einer Repolarisation von -120 mV für 500 ms. Auffällig ist die starke Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von EAG1 (A), die bei der Co-Expression von EAG1 und HERG1-TCCEAG1 (C) nicht zu messen ist.

4 Diskussion

Diese Arbeit beruht auf der Annahme, dass sich im Carboxyterminus einiger Ionenkanäle eine Assemblierungsdomäne (Ludwig *et al.*, 1997) befindet, die eine tetramere Struktur ausbildet und in computergestützten Analysen eine hohe Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung eines Coiled-Coils zeigt. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die funktionelle Analyse dieser Domäne und ihr Einfluss auf die Funktionalität des Ionenkanals.

4.1 Die Stöchiometrie und Struktur der Zusammenlagerung der TCC-Peptide

Aus den mit Hilfe der Gelfiltration gemessenen Elutionsvolumina der TCC-Peptide konnten apparente Molekulargewichte berechnet werden. Sie entsprechen einem Vielfachen des Molekulargewichts, das sich aus den Aminosäuresequenzen berechnen lässt. Die Stöchiometrie der homomeren Zusammenlagerung, die daraus ableitbar ist, liegt für TCC-EAG1, TCC-EAG2 und TCC-ERG1 bei vier bis fünf. Durch die Ergebnisse der kombinierten Lichtstreuung (MALLS) lassen sich die MW_{app} der TCC-Peptide EAG1 und ERG1 genauer ganzzahligen Vielfachen des Molekulargewichts der Monomere zuordnen. Es können Molekulargewichte für diese TCC-Peptidkomplexe berechnet werden, die dem vierfachen Molekulargewicht der Peptide entsprechen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Proteine EAG1, EAG2 und ERG1 carboxyterminal eine Interaktionsdomäne besitzen, die *in vitro* Tetramere ausbilden kann. Daraus lässt sich folgern, dass die porenbildenden α -Untereinheiten der carboxyterminal-assemblierenden Kaliumkanäle sich zu Tetrameren zusammenlagern, wie es auch bei aminoterminal-assemblierenden, spannungsabhängigen Kaliumkanälen des *Shaker*-Typs der Fall ist (Shen *et al.* 1993).

Der höhere Stokes'sche Radius der TCC-Peptide im Vergleich zu den zur Erstellung der Eichgeraden in der Gelfiltration eingesetzten Proteinen erklärt die Abweichungen der Werte, die sich aus der Berechnung der Stöchiometrie der TCC-Peptide sowie aus den Daten der Gelfiltration gegenüber denen des kombinierten MALLS ergeben. Der Austausch einer Aminosäure an Position „a“ des Motivs der siebenfachen Wiederho-

lung in der Aminosäuresequenz der Kontrollpeptide TCC-EAG1L20Y, TCC-EAG2L13Y, TCC-ERG1L20Y und TCC-ERGinsG führt zu einer Ausbildung von unterschiedlichen Multimeren. Der Einfluss des Austausches resultiert nicht in der Ausbildung eines bestimmten Multimers, wie es bei einem Austausch aller Leuzine bzw. Isoleuzine in der Aminosäuresequenz des Leuzin-Zippers GCN4 aus der Hefe der Fall ist. Das resultierende Peptid GCN4_pLI tetramerisiert und GCN4_pIL dimerisiert (Harbury et al., 1993). Dagegen lagern sich die Kontrollpeptide, bei denen nur eine hydrophobe Aminosäure gegen eine polare Aminosäure ausgetauscht wurde, nicht mehr dominant zu Tetrameren zusammen, wie es bei den TCC-Peptiden zu beobachten ist. Sie liegen als Dimere, Trimere und als große Aggregate vor. Das Peptid TCC-ERGinsG kann artifiziell multimerisieren, da die Möglichkeit zur Ausbildung von Disulfidbrücken durch die in der Aminosäuresequenz vorhandenen Cysteine besteht.

Aus den Ergebnissen der CD-Spektroskopie lassen sich α -helikale Strukturanteile der TCC-Peptide von > 70% (TCC-EAG1) bis 90% (TCC-ERG1) berechnen. Dies kann als Grund dafür angenommen werden, dass die TCC-Peptide in ihrer gestreckten helikalen Konformation ein kleineres, relatives Retentionsvolumen haben als die vergleichsweise globulären Eichproteine. In die Berechnung der Molekulargewichte der gelfiltrierten Peptide und Proteine durch den K_{av} -Wert werden keine strukturabhängigen Parameter einbezogen. Die Berechnung wird ausschließlich in Bezug auf die Eigenschaften der Gelfiltrationssäule durchgeführt, wobei Ausschluss- und Bettvolumen der Säule in die Berechnung eingehen.

Für die Interpretation der Ergebnisse der Gelfiltration der TCC-Peptide in Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (6 M) ist es wiederum notwendig, eine Annahme über den Einfluss der Peptidkonformation auf das Retentionsvolumen zu machen, das sich durch die berechneten Vielfachen des Peptidmolekulargewichts (1,5 - 1,6) mit einem Vorliegen der Peptide als Monomer und als Dimer in Einklang bringen lässt. Bei der Annahme einer wiederum eher gestreckten Konformation und dadurch einem höheren Stokes'schem Radius der Peptide gegenüber den globulären Eichproteinen, liegen die TCC-Peptide in Guanidiniumhydrochlorid (6 M) als Monomere vor.

Neben dem hohen helikalen Gehalt der TCC-Peptide konnte mittels der CD-Spektroskopie gezeigt werden, dass die TCC-Peptide eine für Peptide ungewöhnlich hohe Stabilität gegenüber der Hitzedenaturierung aufweisen. Diese Eigenschaften, zusammen mit dem hohen helikalen Gehalt, sind charakteristisch für Coiled-Coils

(Fairman *et al.* 1995; Fassauer *et al.* 1997). Die Ausprägung des Einflusses der *frame-shift* Mutation auf die Assemblierungsdomäne äußert sich bei dem Peptid TCC-ERGinsG mit einem Verlust von knapp 80% helikalen Anteils an der Sekundärstruktur. Damit konnten die mit dem Programm Coils (Version 2.2, Lupas *et al.*, 1996) durchgeführten Analysen zur Ausbildung einer Coiled-Coil Struktur bestätigt werden, nach denen die Wahrscheinlichkeit für diese Sekundärstruktur mit Null angegeben wurde (nicht gezeigt).

Anhand der Schmelzkurven konnte die Stabilität der TCC-Peptide im Vergleich zu den Kontrollpeptiden unter hitzedenaturierenden Bedingungen gezeigt werden. Die Stabilität der TCC-Peptide liegt oberhalb derjenigen der Kontrollpeptide, die schon maximal denaturiert in Natriumphosphat unter Hitzeeinwirkung vorlagen. Die Stabilität der TCC-Peptide EAG1, EAG2 und ERG1 ist vergleichbar mit der des antiparallelen, tetrameren Coiled-Coils, durch das der Lac-Repressor assembliert (Fairman *et al.* 1995). Auch kann die Vorhersage der Sekundärstruktur (Coils Version 2.2, Lupas *et al.*, 1996) als zutreffend angenommen werden.

Die TCC-Peptide EAG1 und EAG2 zeigen bei einer Sequenzähnlichkeit von 85% (ausgehend von den Eigenschaften der Aminosäurereste) und 64% identischer Sequenz eine vergleichbare Stabilität unter Hitzeeinwirkung. Die Kontrollpeptide TCC-EAG1L20Y, TCC-EAG2L13Y und TCC-ERG1L20Y sind vergleichsweise hitzeempfindlich. Sie liegen schon bei Temperaturen von 49°C, 60°C und 68°C halbdenaturiert vor. Der Austausch einer Aminosäure reicht aus, um die Stabilität der Coiled-Coil Struktur drastisch zu vermindern. Während der Renaturierungsphase ist keines der Peptide ausgefallen. Die Temperaturen, bei denen die Peptide in Phosphatpuffer halbmaximal denaturiert sind, liegen in der Denaturierungsphase um 5°C höher als in der Renaturierungsphase. Diese Verschiebung der Denaturierungskurve gegenüber der Renaturierungskurve (Hysterese) lässt erkennen, dass es die Kinetik der Konformationsumwandlung der Peptide beim gewählten Temperaturgradienten von 3°C / min nicht zulässt, dass sich die Faltung der Peptide jeweils im Äquilibrium befindet. Die Aufnahme der CD-Spektren im Wellenlängenbereich von 190 nm bis 260 nm zeigt neben der Hitzestabilität weitere Merkmale, die den TCC-Peptiden mit anderen Coiled-Coil-Peptiden gemein ist. Sie zeigen den Übergang der Sekundärstruktur von der α -helikalen zu nur einer ungeordneten Struktur. Die CD-Spektren der TCC-Peptide EAG2, ERG1 und der Kontroll-Peptide haben bei allen gemessenen Temperaturen

einen gemeinsamen Schnittpunkt bei etwa 204 nm. Dies zeigt, dass diese Peptide in nur zwei Sekundärstrukturen in messbaren Konzentrationen vorliegen. Für TCC-EAG1 ist das für Temperaturen unterhalb von 40°C nicht der Fall. Das Ergebnis ist qualitativ reproduzierbar, wobei die Ausprägung des Effekts variiert (nicht gezeigt). Die bei 80°C und 90°C dominant vorliegende Struktur lässt sich nur als ungeordnet beschreiben. Die Aufklärung der Sekundärstruktur des Poly-L-Lysin zeigt jedoch Möglichkeiten auf, den denaturierten Zustand der Sekundärstruktur der TCC-Peptide zu beschreiben. Die Sekundärstruktur des Poly-L-Lysins liegt lösungsmittelabhängig als 100% α -helikal, 100% β -Faltblatt oder als 100% Random-Coil vor (Greenfield *et al.* 1969). Die molare Elliptizität einer reinen α -Helix hat bei $\Delta\epsilon_{222}$ einen Wert von -10 , eine β -Faltblattstruktur von -5 und ein Random-Coil bei $\Delta\epsilon_{222} = +1$ (Greenfield *et al.* 1969). Die Schmelzkurven der TCC-Peptide in Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (3,5 M) bilden bei Temperaturen oberhalb von 80°C ein Plateau bei einem $\Delta\epsilon_{222}$ von -2 aus. Dadurch lässt sich die Sekundärstruktur der Peptide weder eindeutig einem Random-Coil noch einer β -Faltblattstruktur zuordnen. Dass die TCC-Peptide bei der Hitzedenaturierung ein $\Delta\epsilon_{222}$ -Plateau mit einem Wert kleiner Null ausbilden, ist vergleichbar mit den Werten, die für andere Coiled-Coils publiziert sind (Fairman *et al.* 1995; Fassauer *et al.* 1997).

4.2 Interaktionsmessungen

Die Verwendung der Oberflächen-Plasmonresonanz zeigt die Kinetik und die Spezifität der Interaktion der TCC-Peptide. Alle Peptide wurden an dem Aminoterminus acetyliert und am Carboxyterminus amidiert, um Helix-destabilisierende Ladungsinteraktionen der terminalen Aminosäure mit dem Helix-Dipol auszuschließen (Shoemaker *et al.* 1987). Für das an die carboxylierte Dextran-Matrix des Sensorchips (CM5-Chips, Biacore) gekoppelte TCC-Peptid ERG1 bestand die Möglichkeit der carboxyterminalen Modifikation nicht. In den Aminosäureresten der Primärsequenz dieses Peptids fehlen freie Aminogruppen, die für die Kopplung eines Peptids an die EDC / NHS aktivierte Dextranmatrix notwendig sind. Für die Interaktionsstudien und in allen anderen Versuchen wurde das TCC-Peptid ERG1 am Amino- und Carboxyterminus modifiziert eingesetzt.

Die homomeren Tetramere der TCC-Peptide EAG1, EAG2 und ERG1 sind stabiler als die untersuchten heteromeren Komplexe, die sich aus den verwendeten Peptiden bilden lassen. Dies zeigt sich in der Oberflächen-Plasmonresonanz vor allem durch eine langsame Abnahme der Resonanzeinheiten während der Dissoziationsphase. Wendet man dieses Kriterium auf die Beurteilung der Ausbildung heteromerer Tetramere an, wird die Spezifität der Interaktion deutlich: Nur die TCC-Peptide der EAG-Unterfamilie, EAG1 und EAG2, bilden stabile heteromere Komplexe miteinander aus. Diese werden jedoch mit einer geringeren Stabilität gebildet als die homomeren Komplexe. Die TCC-Peptide der EAG-Unterfamilie interagieren nicht mit der TCC-Domäne des zur EAG-Superfamilie gehörenden ERG1. Eine wenig spezifische Interaktion zeigen die Kontrollpeptide mit den entsprechenden immobilisierten TCC-Peptiden. Die Interaktionen der Kontrollpeptide (Anhang A) mit den TCC-Peptiden sind vor allem durch eine rasche Dissoziation gekennzeichnet. Für das Zustandekommen der TCC- Kontrollpeptid Komplexe kann die geringe Stabilität der Kontrollpeptide als Ursache angenommen werden. Für diese Art der Bindung ist es dann ausreichend, dass von einer amphiphilen Helix hydrophobe Seitenkette angeboten werden und einige der *e-g* Interaktionen zu einer Stabilisierung des Komplexes führen. Das Peptid TCC-ERGinsG zeigt weder eine homo- noch heterologe Interaktion. Aus den Ergebnissen der mit Oberflächen-Plasmonresonanz durchgeführten Experimente lässt sich ableiten, dass die Peptide in der Lage sind, die Spezifität der Zusammenlagerung zu determinieren.

Der Ansatz dieser Untersuchungen könnte mit den entsprechenden TCC-Peptiden dahingehend erweitert werden, dass Aufschluss darüber gewonnen wird, ob alle Ionenkanäle, die über TCC-Domänen assemblieren, nur jeweils mit den Proteinen ihrer Genunterfamilie stabile Komplexe bilden können. Ein solches Verhalten ist für die aminoterminal assemblierenden spannungsabhängigen Ionenkanäle (Kv) beschrieben worden (Xu *et al.* 1995). Interaktionen zwischen Kanälen der EAG-Superfamilie und Kanälen der Kv Familie (des Shaker Typs) wurden lange Zeit diskutiert (Chen *et al.*, 1996, 2000; Tang *et al.*, 1998; Zhong and Wu 1991, 1993; Brüggemann *et al.*, 1993). Trotz der elektrophysiologischen Messungen, die auf eine Co-Assemblierung beider Arten von Untereinheiten schließen lässt, unterstützen biochemische Daten solch eine Interaktion nicht. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen den Schluss nahe, dass eine solche Assemblierung energetisch gesehen sehr unvorteilhaft wäre. Eine Heteromultime-

risierung zwischen der TCC-Domäne aus EAG oder anderen Ionenkanal bildenden α -Untereinheiten (s. 2.2.1) und der T1-Domäne der Kv α -Untereinheiten hätte eine Exposition der hydrophoben Bereiche dieser Assemblierungsdomänen in wässriges Milieu zur Folge.

Die in dieser Arbeit beschriebene Methode - Anwendung der Oberflächen-Plasmonresonanz auf TCC-Domänen - ist gut geeignet, mögliche heterologe Assemblierungen auf recht einfache Weise zu untersuchen. Dies ist ein Parameter, der elektrophysiologisch oft nur schwer zugänglich ist. So könnten TCC-Domänen weiterer Mitglieder der EAG-Superfamilie (ERG und ELK) sowie KCNQ1 – KCNQ5 und vieler anderer Ionenkanalfamilien (z.B. SK, CNG) untersucht werden.

4.3 Elektrophysiologische Messungen

In den elektrophysiologischen Experimenten konnten keine Kaliumströme nach Expression des Kanalkonstruktes HERG-TCCERGinsG (Anhang C) gemessen werden, obwohl die Verteilung von HERG-TCCERGinsG und ERG1 in der Zellmembran vergleichbar waren. Der Hauptteil des Proteins lag bei beiden Expressionen intrazellulär im Endoplasmatischen Reticulum vor. Nach homomerer Expression von EAG1 und ERG1 waren typische makroskopische Ströme messbar. Daher kann angenommen werden, dass die fehlende TCC-Domäne in HERG-TCCERGinsG verantwortlich für die Disfunktionalität des Kanals ist. Durch Einfügen der TCC-Domäne des EAG1 Ionenkanals konnte die Funktionalität von HERG-TCCERGinsG wieder hergestellt werden. Die Ergebnisse der Co-Expression von EAG1-Wildtyp und HERG1-Wildtyp entsprechen der theoretischen, linearen Addition der Ströme, die aus der homologen Expression der Kanäle erhalten wurde. Somit wurden in diesem Experiment zwei unterschiedliche und unabhängige Kanalpopulationen gemessen. Im Gegensatz dazu führte die Co-Expression von HERG-TCCEAG1 mit EAG1 zu einem Kanal mit neuen Eigenschaften. Die Kinetik der Aktivierung wurde verlangsamt, der „Cole and Moore“ Effekt (die Abhängigkeit der Aktivierungskinetik von dem zuvor angelegten Potential vor dem Stimulus (Terlau *et al.*, 1997)) wurde inhibiert und die Eigenschaften der Kanäle während der Deaktivierung dahingehend verändert, dass eine neue Formation von heteromeren Kanälen sicher angenommen werden kann.

4.4 Die Funktionalität der TCC-Domäne scheint pathologische relevant zu sein

Fehlfunktionen von Ionenkanälen können mit Krankheitsbildern in Verbindung gebracht werden (Channelopathies). Das Gebiet der Channelopathies umfasst eine Gruppe pathologischer Störungen, die nach ihren zugrundeliegenden molekularen Defekten an Ionenkanälen, benannt wird. Einige Ionenkanäle mit einer carboxyterminalen TCC-Domäne sind in die Pathogenese menschlicher Krankheiten involviert. Dazu gehören:

Herzarrhythmie	(KCNQ1 (Wang <i>et al.</i> , 1996), hERG1 (Curran <i>et al.</i> , 1995)), herg1 (Curran <i>et al.</i> , 1995)),
Epilepsie	(KCNQ2 (Singh <i>et al.</i> , 1998), (Biervert <i>et al.</i> , 1998), KCNQ3 (Charlier <i>et al.</i> , 1998)),
Taubheit	(KCNQ1 (Neyroud <i>et al.</i> , 1997), KCNQ4 (Kubisch <i>et al.</i> , 1999)),
Sehstörungen	(CNGA1 (Dryja <i>et al.</i> , 1995), CNGA3 (Kohl <i>et al.</i> , 1998)) und
Nierenfehlfunktionen	(PKD1 (European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994), PKD2 (Mochizuki <i>et al.</i> , 1996)).

Die Funktion der TCC-Domäne ist für die korrekte Funktionalität des gesamten Ionenkanals von entscheidender Bedeutung. Veränderungen ihrer Struktur sind für die genannten Krankheiten charakteristisch. Eine Suche nach beschriebenen Mutationen, die entweder direkt das Motiv der vorhergesagten TCC-Domäne im C-Terminus dieser Proteine ändern oder es zerstören, wurde in Datenbanken des humanen Genoms durchgeführt. Tabelle 2 zeigt eine Liste von Mutationen, in denen die Aminosäuresequenzen im intrazellulären C-Terminus bis zu 100 Aminosäuren vor der TCC enthalten sind, und die das Motiv der TCC-Domäne beeinflussen. Die Resultate der Suche ergaben, dass das Spektrum der Phänotypen mit anormalen TCC-Domänen im entsprechenden Protein von dem Lange-QT Syndrom, dem autosomal dominanten Romano-Ward-Syndrom, der Typ 1 (LQT1) und Typ 2 (LQT2) des autosomal rezessive Romano-Ward-Typ LQT, dem Jervell und Lange-Nielsen LQT-Syndrom, der „benignen neonatalen und infantilen Konvulsion“ (BNFC), der *Retinitis Pigmentosa*, der autosomal dominanten polyzystischen Nierenkrankheit und der Farbblindheit bis zur Taubheit reicht (Tabelle 2) und in einigen Fällen der dysfunktionellen TCC-Domäne zugeschrieben werden kann.

Tabelle 2: Pathologisch relevante Mutationen führen zu Sequenzänderungen der TCC-Domänen

Die Tabelle zeigt die Gene, den offenen Leserahmen (ORF), den Anfang des putativen C-Terminus (CT), den Bereich der TCC-Domäne bzw. die TCC α - und TCC β -Domäne, den Effekt der Mutation auf die Sequenz und den resultierenden pathologischen Phänotyp. Die Proteine sind hERG1 (NP000229), KCNQ1 & 2 (AAC51776, CAA75348), CNGA1 (P29973), and PKD1 & 2 (AAB59488, AAC16004).

Gen	ORF	CT	TCC	Mutation	Phenotyp	Referenz
KCNQ1	676	>262	α : 537-567 β : 587-621	R518X	LQT1, JLN	(Wang <i>et al.</i> , 1996) (Larsen <i>et al.</i> , 1999)
				Q530X	LQT1	(Splawski <i>et al.</i> , 2000)
				R533W ^{*)}	AR-RW	(Chouabe <i>et al.</i> , 1997)
				R539W ^{*)}	LQT1	(Chouabe <i>et al.</i> , 2000)
				E543fs/107	JLN	(Neyroud <i>et al.</i> , 1997)
				R555C	LQT1	(Donger <i>et al.</i> , 1997)
				S566F	LQT1	(Splawski <i>et al.</i> , 2000)
				R583C	LQT1	(Splawski <i>et al.</i> , 2000)
				T587M	JLN, LQT1	(Chouabe <i>et al.</i> , 2000)
				R591H	RW, LQT1	(Neyroud <i>et al.</i> , 1999)
				R594Q	LQT1	(Splawski <i>et al.</i> , 2000)
				KCNQ2	844	>320
C516sp	BFNC	(Singh <i>et al.</i> , 1998)				
Y534fs/4	BFNC	(Biervert <i>et al.</i> , 1998)				
Y616fs/286	BFNC	(Biervert <i>et al.</i> , 1999)				
herg1	1159	>663	1037-1074	P968fs/4	LQT2	(Splawski <i>et al.</i> , 2000)
				P986fs/130	LQT2	(Splawski <i>et al.</i> , 2000)
				R1014X	LQT2	(Splawski <i>et al.</i> , 2000)
				G1031fs/24	LQT2	(Splawski <i>et al.</i> , 2000)
				G1036fs/82	LQT2	(Berthet <i>et al.</i> , 1999)
CNGA1	686	>401	618-663	R654fs/1	RP	(Dryja <i>et al.</i> , 1995)
PKD1	4302	>4110	4213-4246	Q4124X	ADPKD	(Badenas <i>et al.</i> , 1999)
				Y2126X	ADPKD	(Turco <i>et al.</i> , 1997)
				F4148sp	ADPKD	(Badenas <i>et al.</i> , 1999)
				W4139X	ADPKD	(Perrichot <i>et al.</i> , 1999)
				K4169fs/35	ADPKD	(Perrichot <i>et al.</i> , 1999)
				S4178fs/18	ADPKD	(Peral <i>et al.</i> , 1997)
				G4201fs/146	ADPKD /aCD	(Torra <i>et al.</i> , 1997)
				Q4224P	ADPKD	(Badenas <i>et al.</i> , 1999)
				R4227X	ADPKD	(Peral <i>et al.</i> , 1996)
Y4236X	ADPKD	(Perrichot <i>et al.</i> , 2000)				
PKD2	968	>681	837-870	R742X	ADPKD	(Mochizuki <i>et al.</i> , 1996)
				G747sp	ADPKD	(Veldhuisen <i>et al.</i> , 1997)
				Y762X	ADPKD	(Veldhuisen <i>et al.</i> , 1997)
				R807X	ADPKD	(Viribay <i>et al.</i> , 1997)
				E837X	ADPKD	(Viribay <i>et al.</i> , 1997)
				F838fs/6	ADPKD	(Torra <i>et al.</i> , 1999)

Wenn die TCC-Domäne von essentieller Bedeutung für die Funktionalität des Ionenkanals ist, worauf die Ergebnisse dieser Arbeit schließen lassen, so wird jede Mutation, die diese Struktur beeinflusst, gleichzeitig die Funktion des Kanals beeinflussen und sich dadurch pathologisch in diversen Phänotypen äußern. 38 Mutationen in sieben verschiedenen Genen, die die Struktur der Coiled-Coil Domäne der resultierenden Ionenkanäle beeinflussen, zeigen, dass die TCC-Domäne ein sogenannter „Hot-Spot“ für Mutationen ist, der mitverantwortlich für Krankheiten sein könnte, die durch Fehlfunktionen von Ionenkanälen hervorgerufen werden. Im Falle der polycystischen Nierenkrankheit wurde gezeigt, dass die Co-Assemblierung der Produkte der Gene PKD1 und PKD2 für die normale Funktion des Ionenkanals notwendig ist (Hanaoka *et al.*, 2000).

Die durch Mutation der TCC-Domäne hervorgerufenen pathologischen Phänotypen sowie die elektrophysiologischen Experimente zeigen eindeutig, dass ein C-terminal assemblierender Ionenkanal ohne eine TCC-Domäne nicht funktionell ist. Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit dem Modell, dass die intakte TCC-Domäne eine wichtige Rolle in der Assemblierung von α -Untereinheiten zu einem funktionellen Ionenkanal spielt.

5 Zusammenfassung

Der spannungsabhängige Kaliumkanal EAG1 besitzt eine carboxyterminale 40 Aminosäuren lange Domäne, die für die Assemblierung von vier α -Untereinheiten zu einem funktionellen Kanal verantwortlich ist.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war zunächst die Analyse der Sekundärstruktur dieser Assemblierungsdomäne, sowie die Identifikation weiterer Ionenkanäle, die im Carboxyterminus eine strukturelle Homologie zur Assemblierungsdomäne des EAG1-Ionenkanals zeigen. Darüber hinaus sollten Aussagen über die Bedeutung der Domäne für die Funktion des jeweiligen Ionenkanals getroffen werden. Computergestützte Analysen der Sekundärstruktur ergaben, dass strukturell konservierte homologe Domänen in den Familien der durch zyklische Nukleotide gesteuerten Kationenkanälen (CNG), in den spannungsabhängigen kaliumselektiven Kanälen (neben EAG, auch in ELK, ERG und KCNQ), in den calciumabhängigen Kaliumkanälen (SK, IK), in den nicht selektiven Kationenkanälen (PKD) und in den Calciumkanälen (TRP) zu finden sind. Diese Ionenkanäle zeigen in computergestützten Analysen Domänen, mit einer hohen Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer Coiled-Coil Struktur im Carboxyterminus.

Im zweiten Teil ging es darum, die berechnete Sekundärstruktur experimentell zu belegen. Dazu wurden die carboxyterminal gelegenen Proteinbereiche mit einer Möglichkeit zur Ausbildung eines Coiled-Coils exemplarisch von den Kanälen EAG1, EAG2 und ERG1 als Peptide synthetisiert und analysiert.

Anhand von Gelfiltrationsexperimenten und Lichtstreuung wurde die Stöchiometrie der Peptid-Assemblierung als Tetramerisierung identifiziert.

Mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie konnte ein hoher α -helikaler Strukturanteil und eine außerordentliche Stabilität gegenüber hitzedenaturierenden Bedingungen gezeigt werden. Aus diesen Daten kann, in Übereinstimmung mit computergestützten Analysen der Aminosäuresequenz, geschlossen werden, dass die Peptide zu tetrameren Coiled-Coils assemblieren.

In Analogie kann diese Art der Zusammenlagerung ebenfalls für die α -Untereinheiten der Ionenkanäle angenommen werden, für die in computergestützten Analysen eine hohe Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung eines Coiled-Coils berechnet werden konnte. Die dafür verantwortliche Domäne wurde als „Tetramerisierende Coiled-Coil“ (TCC) Domäne benannt und kann als generelles Strukturmotiv angenommen werden.

Im dritten Teil wurde ein auf Oberflächen-Plasmonresonanz basierender Proteininteraktionstest entwickelt, der es ermöglicht, die Kinetik der Tetramerisierung in Echtzeit zu verfolgen. Für die Peptide, deren Aminosäuresequenz der TCC-Domäne eines funktionellen Ionenkanals entsprach, konnte eine Ausbildung homomerer Komplexe gezeigt werden.

Eine stabile heterologe Interaktion konnte nur zwischen den aus einer Proteinunterfamilie stammenden Domänen EAG1 und EAG2 gemessen werden. Dagegen interagierten diese Peptide nicht mit der Interaktionsdomäne aus ERG1. Die TCC-Domäne ist demnach in der Lage, die Spezifität der Bindung zu bestimmen.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Sekundärstrukturanalyse stand nun die Bedeutung der TCC-Domäne für die Funktionalität des jeweiligen Ionenkanals im Zentrum dieser Arbeit. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Austausch einer hydrophoben Aminosäure gegen eine polare Aminosäure innerhalb des Coiled-Coils drastische Auswirkungen auf die Funktion dieser ca. 40 Aminosäuren langen Domäne hatte. Diese Peptide lagen nur noch zu einem geringen Anteil als Tetramere vor und wiesen eine deutlich geringere Stabilität gegenüber hitzedenaturierenden Bedingungen auf. Im Proteininteraktionsassay äußerte sich der Einfluss des Austausches in einer rascheren Assoziations- und Dissoziationsphase im Vergleich zu den tetrameren Coiled-Coil Peptiden.

In vivo durchgeführte elektrophysiologische Messungen an Ionenkanalkonstrukten bestätigten die physiologische Relevanz der TCC-Domäne. Die Abwesenheit dieser Domäne in HERG1 führte zu einem Verlust der Funktion des Ionenkanals. Diese konnte jedoch durch Klonierung der entsprechenden TCC-Domäne des EAG1-Ionenkanals in den HERG1-Ionenkanal wieder hergestellt werden. Das Ionenkanalkonstrukt, bestehend aus dem HERG1-Kanal mit der TCC-EAG1 Domäne konnte, im Gegensatz zu dem HERG1 Wildtyp, funktionelle Heteromultimere mit EAG1 α -Untereinheiten bilden, so dass ein Ionenkanal mit veränderten Eigenschaften elektrophysiologisch beschrieben werden konnte.

Die Relevanz der TCC-Domäne für die Funktionalität des Ionenkanals wird auch durch natürlich vorkommende Mutationen belegt. Diese beeinflussen die Struktur und damit die Funktion der TCC-Domäne. In Datenbanken des humanen Genoms konnten 38 Mutationen in sieben verschiedenen Genen identifiziert werden, die die Struktur der Coiled-Coil Domäne der resultierenden Ionenkanäle beeinflussen. Diese Mutationen äußern sich in zahlreichen phänotypischen Krankheitsbildern.

6 Literatur

Andrade, M. A., Perez-Iratxeta, C., Ponting, C. P. (2001). Protein repeats: structures, functions, and evolution. *Journal of Structural Biology*. 134, 117-131.

Badenas, C., Torra, R., San Millan, J. L., Lucero, L., Mila, M., Estivill, X., and Darnell, A. (1999). Mutational analysis within the 3' region of the PKD1 gene. *Kidney Internat.* 55, 1225-1233.

Berthet, M., Denjoy, I., Donger, C., Demay, L., Hammoude, H., Klug, D., Schulze-Bahr, E., Richard, P., Funke, H., Schwartz, K. (1999). C-terminal HERG mutations: the role of hypokalemia and a KCNQ1-associated mutation in cardiac event occurrence. *Circulation* 99, 1464-1470.

Biervert, C., Schroeder, B. C., Kubisch, C., Berkovic, S. F., Propping, P., Jentsch, T. J., Steinlein, O. K. (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279, 403-406.

Biervert, C., Steinlein, O. K. (1999). Structural and mutational analysis of KCNQ2, the major gene locus for benign familial neonatal convulsions. *Hum. Genet.* 104, 234-240.

Böhm, G., Muhr, R., Jaenicke, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* 5, 191-195.

Charlier, C., Singh, N. A., Ryan, S. G., Lewis, T. B., Reus, B. E., Leach, R. J., Lepert, M. (1998). A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family, *Nat. Genet.* 18, 53-55.

Chen, X. Z., Vassilev, P. M., Basora, N., Peng, J. B., Nomura, H., Segal, Y., Brown, E. M., Reeders, S. T., Hediger, M. A., Zhou, J. (1999). Polycystin-L is a calcium-regulated cation channel permeable to calcium ions. *Nature* 401, 383-386.

Choe, S., (2002). Potassium channel structures. *Nat. Rev. Neuroscience* 3, 115-121.

Chouabe, C., Neyroud, N., Guicheney, P., Lazdunski, M., Romey, G., Barhanin, J. (1997). Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J.* 16, 5472-5479.

Chouabe, C., Neyroud, N., Richard, P., Denjoy, I., Hainque, B., Romey, G., Drici, M. D., Guicheney, P., Barhanin, J. (2000). Novel mutations in KvLQT1 that affect I_{Ks} activation through interactions with Isk. *Cardiovasc. Res.* 45, 971-980.

Cohen, C., Parry, D. A. (1990). Alpha-helical coiled coils and bundles: how to design an alpha-helical protein. *Proteins* 7, 1-15.

Curran, M. E., Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D., Keating, M. T. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80, 795-803.

Donger, C., Denjoy, I., Berthet, M., Neyroud, N., Cruaud, C., Bennaceur, M., Chivoret, G., Schwartz, K., Coumel, P., Guicheney, P. (1997). KVLQT1 C-terminal missense mutation causes a forme fruste long-QT syndrome. *Circulation* 96, 2778-2781.

Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., MacKinnon, R. (1998). The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science* 280, 69-77.

Dryja, T. P., Finn, J. T., Peng, Y. W., McGee, T. L., Berson, E. L., Yau, K. W. (1995). Mutations in the gene encoding the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 10177-10181.

European-Polycystic-Kidney-Disease-Consortium (1994). The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. The European Polycystic Kidney Disease Consortium, *Cell* 78, 725.

Fassauer, D., Bruns, D., Shen, B., Jahn R., Brünger A. T. (1997). A Structural Change Occurs upon Binding of Syntaxin to SNAP-25. *J. Biol. Chem.* 272, 4582-4590.

Groves, M. R., Barford, D. (1999). Topological characteristics of helical repeat proteins. *Current Opinion in Structural Biology.* 9, 383-389.

Groves, M. R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B. A., Barford, D. (1999). The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell.* 96, 99-110.

Hanaoka, K., Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A. K., Piontek, K., Tsiokas, L., Sukhatme, V. P., Guggino, W. B. , Germino, G. G. (2000). Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 408, 990-994.

Harbury, P. B., Zhang, T., Kim, P. S., Alber, T. (1993). A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science* 262, 1401-1407.

Heeckeren, W. J. van, Sellers, J. W., Struhl, K. (1992). Role of the conserved leucines in the leucine zipper dimerization motif of yeast GCN4. *Nucleic Acids Research* 20, 3721-3724.

Jönsson, U., Fägerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Löfas, S., Persson, B., Roos, H., Rönnberg, I., Sjölander, S., Stenberg, E., Stahlberg, R., Urbaniczky, C., Östlin, H., Malmqvist, M. (1991). Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *BioTechniques* 11, 620-627.

Karlsson, R., Michaelsson, A., Mattsson, L. (1991). Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J. Immunol. Methods* 145, 229-240.

Kaufmann, S. H., Hengartner, M. O. (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in Cell Biology* 11, 526-534.

Kohl, S., Marx, T., Giddings, I., Jagle, H., Jacobson, S. G., Apfelstedt-Sylla, E., Zrenner, E., Sharpe, L. T., Wissinger, B. (1998). Total colourblindness is caused by mutations in the gene encoding the alpha-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated cation channel. *Nat. Genet.* 19, 257-259.

Kreusch, A., Pfaffinger, P. J., Stevens, C. F., Choe, S. (1998). Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* 392, 945-948.

Krieg, P. A., Melton, D. A. (1987). In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods in Enzymology.* 155, 397-415.

Kronman, M. J., Timasheff, S. N., Colter, J. S., Brown, R. A. (1960). Light-Scattering Studies on Ascites Tumor Cell RNA. *Biochim. Biophys. Acta* 40, 410-417.

Kubisch, C., Schroeder, B. C., Friedrich, T., Lutjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C., Jentsch, T. J. (1999). KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96, 437-446.

Larsen, L. A., Fosdal, I., Andersen, P. S., Kanters, J. K., Vuust, J., Wettrell, G., Christiansen, M. (1999). Recessive Romano-Ward syndrome associated with compound heterozygosity for two mutations in the KVLQT1 gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 7, 724-728.

Ludwig, J., Terlau, H., Wunder, F., Bruggemann, A., Pardo, L. A., Marquardt, A., Stuhmer, W., Pongs, O. (1994). Functional expression of a rat homologue of the voltage gated ether-a-go-go potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the *Drosophila* channel and its mammalian counterpart. *EMBO Journal*. 13, 4451-4458.

Ludwig, J., Owen, D., Pongs, O. (1997). Carboxy-terminal domain mediates assembly of the voltage-gated rat ether-a-go-go potassium channel. *EMBO J*. 16, 6337-6345.

Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.* 21, 375-382.

Lupas, A., Van Dyke, M., Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252, 1162-1164.

Merrifield, R. B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Amer Chem Soc* 85:2149-2154.

Minor, D. L., Lin, Y. F., Mobley, B. C., Avelar, A., Jan, Y. N., Jan, L. Y., Berger, J.M. (2000). The polar T1 interface is linked to conformational changes that open the voltage-gated potassium channel. *Cell*, 102, 657-670.

Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S. L., Veldhuisen, B., Saris, J. J., Reynolds, D. M., Cai, Y., Gabow, P. A., Pierides, A. (1996). PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272, 1339-1342.

Neyroud, N., Richard, P., Vignier, N., Donger, C., Denjoy, I., Demay, L., Shkolnikova, M., Pesce, R., Chevalier, P., Hainque, B. (1999). Genomic organization of the *KCNQ1* K⁺ channel gene and identification of C-terminal mutations in the long-QT syndrome. *Circ. Res.* 84, 290-297.

Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Faure, S., Gary, F., Coumel, P., Petit, C. (1997). A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat. Genet.* 15, 186-189.

Ophoff, R. A., Terwindt, G. M., Vergouwe, M. N., Eijk, R. van, Oefner, P. J., Hoffman, S. M., Lamerdin, J. E., Mohrenweiser, H. W., Bulman, D. E., Ferrari, M. (1996). Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca^{2+} channel gene CACNL1A4. *Cell* 87, 543-552.

O'Shea, E. K., Rutkowski, R., Kim, P. S. (1989). Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* 243, 538-542.

Papazian, D. M., Timpe, L. C., Jan, Y. N., Jan L.Y. (1991). Alteration of Voltage-Dependence of Shaker Potassium Channel by Mutations in the S4 Sequence. *Nature* 369, 289-294.

Pardo, L. A., Camino, D. del, Sánchez, A., Alves, F., Brüggemann, A., Beckh, S., Stühmer, W. (1999). Oncogenic potential of EAG K^+ channels. *EMBO J.* 18, 5540-5547.

Pawson, T. (1995). Protein modules and signalling networks *Nature.* 373, 573-580.

Peral, B., Gamble, V., Strong, C., Ong, A. C., Sloane-Stanley, J., Zerres, K., Winearls, C. G., Harris, P. C. (1997). Identification of mutations in the duplicated region of the polycystic kidney disease 1 gene (PKD1) by a novel approach. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 1399-13410.

Peral, B., San Millan, J. L., Ong, A. C., Gamble, V., Ward, C. J., Strong, C., and Harris, P. C. (1996). Screening the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene reveals six novel mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 86-96.

-
- Perrichot, R., Mercier, B., Carre, A., Cledes, J., Ferec, C. (2000). Identification of 3 novel mutations (Y4236X, Q3820X, 11745+2 ins3) in autosomal dominant polycystic kidney disease 1 gene (PKD1), *Hum. Mut.* 15, 582.
- Perrichot, R. A., Mercier, B., Simon, P. M., Whebe, B., Cledes, J., Ferec, C. (1999). DGGE screening of PKD1 gene reveals novel mutations in a large cohort of 146 unrelated patients. *Hum. Genet.* 105, 231-239.
- Sathe, S. S., Harte, P. J. (1995). The *Drosophila* extra sex combs protein contains WD motifs essential for its function as a repressor of homeotic genes. *Mechanisms of Development.* 52, 77-87.
- Schmitt, N., Schwarz, M., Peretz, A., Abitbol, I., Attali, B., Pongs, O. (2000). A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J.* 19, 332-340.
- Schönherr, R., Gessner, G., Lober, K., Heinemann, S. H. (2002). Functional distinction of human EAG1 and EAG2 potassium channels. *FEBS Letters.* 514, 204-208.
- Singh, N. A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B. R., Leach, R. J., Melis, R., Ronen, G. M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J. V. (1998). A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat. Genet.* 18, 25-29.
- Splawski, I., Shen, J., Timothy, K. W., Lehmann, M. H., Priori, S., Robinson, J. L., Moss, A. J., Schwartz, P. J., Towbin, J. A., Vincent, G. M., Keating, M. T. (2000). Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 102, 1178-1185.
- Stühmer, W. (1992). Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Methods in Enzymology.* 207, 319-339.

- Tarbouriech, N., Curran, J., Ruigrok, R. W., Burmeister, W.P. (2000). Tetrameric coiled coil domain of Sendai virus phosphoprotein. *Nature Structural Biology*. 7, 777-781.
- Terlau, H., Heinemann, S.H., Stuhmer, W., Pongs, O., Ludwig, J. (1997). Amino terminal-dependent gating of the potassium channel rat eag is compensated by a mutation in the S4 segment. *Journal of Physiology*. 502, 537-543.
- Torra, R., Badenas, C., Darnell, A., Bru, C., Escorsell, A., Estivill, X. (1997). Autosomal dominant polycystic kidney disease with anticipation and Caroli's disease associated with a PKD1 mutation. *Rapid communication, Kidney Internat*. 52, 33-38.
- Torra, R., Viribay, M., Telleria, D., Badenas, C., Watson, M., Harris, P., Darnell, A., San Millan, J. L. (1999). Seven novel mutations of the PKD2 gene in families with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 56, 28-33.
- Turco, A. E., Rossetti, S., Bresin, E., English, S., Corra, S., Pignatti, P. F. (1997). Three novel mutations of the PKD1 gene in Italian families with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum. Mut*. 10, 164-167.
- Vaughn, D. E., Rodriguez, J., Lazebnik, Y., Joshua-Tor, L. (1999). Crystal structure of Apaf-1 caspase recruitment domain: an alpha-helical Greek key fold for apoptotic signaling. *Journal of Molecular Biology*. 293, 439-447.
- Veldhuisen, B., Saris, J. J., de Haij, S., Hayashi, T., Reynolds, D. M., Mochizuki, T., Elles, R., Fossdal, R., Bogdanova, N., van Dijk, M. A. (1997). A spectrum of mutations in the second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD2). *Am. J. Hum. Genet*. 61, 547-555.
- Viribay, M., Hayashi, T., Telleria, D., Mochizuki, T., Reynolds, D. M., Alonso, R., Lens, X. M., Moreno, F., Harris, P. C., Somlo, S., San Millan, J. L. (1997). Novel stop

and frameshifting mutations in the autosomal dominant polycystic kidney disease 2 (PKD2) gene. *Hum. Genet.* 101, 229-234.

Wang, Q., Curran, M. E., Splawski, I., Burn, T. C., Millholland, J. M., VanRaay, T. J., Shen, J., Timothy, K. W., Vincent, G. M., de Jager, T. (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat. Genet.* 12, 17-23.

Wilm, M. S., Mann, M. (1994). *Int J Mass Spectrometry and Ion Processes* 136, 164-180.

Wimmers, S., Wulfsen, I., Bauer, C. K., Schwarz, J. R. (2001). Erg1, erg2 and erg3 K channel subunits are able to form heteromultimers. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology.* 441, 450-455.

Wyatt, P. J. (1993). Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Anal. Chim. Acta* 272, 1-40.

Xu, J., Yu, W., Jan, Y., N., Jan, L., Y., Li, M. (1995). Assembly of Voltage-gated Potassium Channels. *J. Biol. Chemistry.* 270, 24761-24768.

Xu, D., Wang, L., Dai, W., Lu, L. (1999). A Requirement for K⁺-Channel Activity in Growth Factor-Mediated Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation in Human Myeloblastic Leukemia ML-1 Cells. *Blood* 94, 139-145.

Yao, X., Kwan, H. Y. (1999). Activity of Voltage-Gated K⁺ Channel is Associated with Cell Proliferation and Ca²⁺ Influx in Carcinoma Cells of Colon Cancer. *Life Science* 65, 55-62.

Zerangue, N., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (2000) An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional Shaker channels lacking T1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 97, 3591-3595.

7 Anhang

A

Sequenzen und isoelektrische Punkte (pI) der untersuchten Peptide

Peptid	Sequenz	pI
TCC-EAG1	TLQAT VLEVR HELKE DIKAL NAKMT NIEKQ LSEIL RILTS	6,57
TCC-EAG1L20Y	TLQAT VLEVR HELKE DIKA $\color{red}{Y}$ NAKMT NIEKQ LSEIL RILTS	6,46
TCC-EAG2	ALQTT LQEVK HELKE DIQLL SCRMT ALEKQ VAEIL KILS	5,75
TCC-EAG2L13Y	ALQTT LQEVK HE $\color{red}{Y}$ KE DIQLL SCRMT ALEKQ VAEIL KILS	5,65
TCC-ERG1	DVESR LDALQ RQLNR LETRL SADMA TVLQL LQRQM TLV	6,44
TCC-ERG1L20Y	DVESR LDALQ RQLNR LETR $\color{red}{Y}$ SADMA TVLQL LQRQM TLV	6,24
TCC-ERGinsG	RRGEQ AGCPP APAQQ AGDPA ECRHG HCPAA ATEAD DAG	4,92

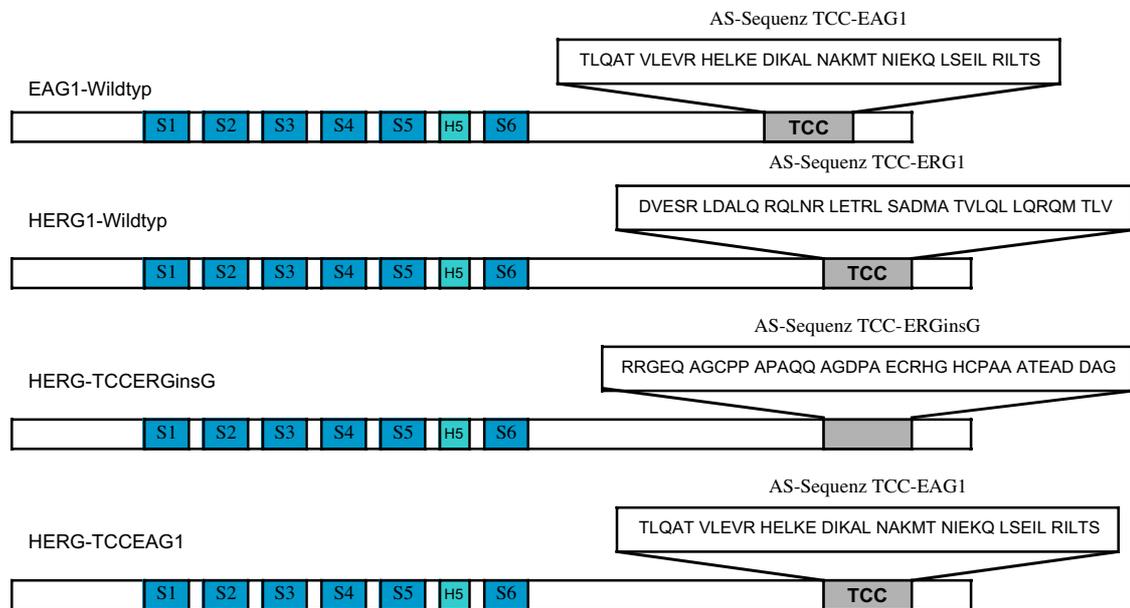
B

Konzentrationen und Molekulargewichte der eingesetzten Eichproteine

Eichproteine	MW	Konzentration
Vitamin B ₁₂	1,4 kDa	0,3mg/ml
Proteinkinase A Inhibitor	2,2 kDa	0,5mg/ml
Aprotinin	6 kDa	2mg/ml
Ribonuclease A	13,7 kDa	5mg/ml
Chymotrypsinogen A	25 kDa	2,5mg/ml
Ovalbumin	43 kDa	2,5mg/ml

C

Ionenkanalkonstrukte, die in den elektrophysiologischen Experimenten untersucht wurden.



Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Stühmer für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung „mbns“ am „Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin“ anfertigen zu können.

Prof. Dr. Lambrecht danke ich für die spontane Bereitschaft zur Betreuung dieser Arbeit.

Bei Dr. Francisco Monje möchte ich mich für seine intensive Hilfe bei den elektrophysiologischen Experimenten bedanken und

Dr. Luis Pardo und Araceli Sanchez danke ich für die Bereitstellung der chimären Ionenkanäle, die Anregungen und die Diskussionsbereitschaft.

Vielen Dank an Dr. Synnöve Beckh, Dr. Ulrike Böer, Dr. Marco Gymnopoulos, Dr. Hendrik Knötken, Dr. Sabine Martin und Claudia Weber für eure hilfreichen Korrekturvorschläge und Diskussionen.

Stefan Parbst, Dr. Dirk Fassauer und Dr. Vinod Subramaniam danke ich für die Einweisung in Arbeitstechniken.

Weiter gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung „Molekulare Biologie neuronaler Signale“, die an der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Vielen Dank Angelika, für die Liebe, sehr viel Unterstützung und Geduld.

Publikationen

Jenke, M., Sánchez, A., Monje, F., Stühmer, W., Weseloh, R.M. & Pardo L.A. (2003). C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. In Druck (Referenz Nummer 9192) EMBO Journal.

Brauns, O., Brauns, S., Jenke, M., Zimmermann, B., Dautzenberg, F.M. (2002). Secondary structure of antisauvagine analogues is important for CRF receptor antagonism: development of antagonists with increased potency and receptor selectivity. *Peptides* 23, 1817-1827.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Marc Jenke
Geburtsdatum	29.10.1970
Geburtsort	Köln
Adresse	Rosdorfer Weg 19a 37073 Göttingen
eMail	mjenke@gmx.de

Bildungsweg

06/91	Abitur an der Immanuel-Kant-Schule in Neumünster
10/93 bis 10/95	Grundstudium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen
19.10.1995	Diplomvorprüfung
10/95 bis 10/98	Hauptstudium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen
28.10.1998	Mündliche Diplomhauptprüfung
11/98 bis 04/00	Vorbereitung und Anfertigung einer externen Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in der Abteilung „Molekulare Biologie neuronaler Signale“ („mbns“) bei Prof. Dr. Walter Stühmer.
04/00 bis 08/02	Durchführung von Arbeiten im Rahmen einer Promotion in der Arbeitsgruppe „EAG - Kanäle“ am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin bei Prof. Dr. Walter Stühmer