

Aus dem Physiologischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Markus Bleich)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

U73122 HEMMT SELEKTIV GIRK- UND MAXIK-
KANÄLE UNABHÄNGIG VON DER
PHOSPHOLIPASE C

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

ANGELIKA KLOSE

aus Stuttgart

KIEL 2011

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. C. Alzheimer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. P. Saftig
Tag der mündlichen Prüfung:	05.12.2011
Zum Druck genehmigt:	Kiel, den 05.12.2011
gez.	Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi

Vorbemerkung

Teilergebnisse dieser Dissertation sind bereits wie folgt veröffentlicht worden:

Sickmann T, Klose A, Huth T & Alzheimer C (2008). Unexpected suppression of neuronal G protein-activated, inwardly rectifying K⁺ current by common phospholipase C inhibitor. *Neurosci Lett* 436, 102-106.

Klose A, Huth T & Alzheimer C (2008). 1-[6-[[[(17beta)-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrro le-2,5-dione (U73122) selectively inhibits Kir3 and BK channels in a phospholipase C-independent fashion. *Mol Pharmacol* 74, 1203-1214.

Huth T, Klose A & Alzheimer C. Bupivacaine blocks large conductance calcium-activated channels (MaxiK). In Vorbereitung.

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung.....	1
1.1 Phospholipase C und PIP ₂	1
1.2 Für diese Arbeit wichtige Grundlagen der K ⁺ -Kanäle.....	3
1.2.1 Die einwärts-gleichrichtenden K ⁺ -Kanäle.....	6
1.2.2 Für diese Arbeit wichtige Kir-Unterfamilien und die Modifikation der Kanal-PIP ₂ - Bindungsaffinität durch Co-Faktoren.....	10
1.2.3 Die Ca ²⁺ -aktivierten K ⁺ -Kanäle	15
1.2.4 Der MaxiK	16
1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit.....	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Molekularbiologie	23
2.1.1 Die Zellkultur	23
2.1.2 Verwendete Kanäle und Vektoren.....	24
2.1.3 Klonierung der Bakterien und Plasmidgewinnung	24
2.1.4 Verwendete Nachweismethoden.....	26
2.1.5 Eingesetzte Mutationsmethoden	28
2.1.6 Die Transfektion	30
2.2 Dissoziierte Zellen.....	32
2.3 Elektrophysiologie	33
2.3.1 Die Patch-Clamp-Technik	33
2.3.2 Der Patch-Clamp-Aufbau	35
2.3.3 Herstellung der Pipetten und Elektroden	38
2.3.4 Die verwendeten Messlösungen	39
2.3.5 Die Versuchsdurchführung.....	42
2.3.6 Auswertung und Darstellung	44
2.4 Das konfokale Mikroskop	46
2.5 Die Ca ²⁺ -Elektrode	47
3 Ergebnisse	49
3.1 Messungen an akut isolierten, neokortikalen Pyramidenzellen.....	49
3.1.1 Wirkung von U73122 und U73343 auf GIRK-Kanäle.....	49
3.1.2 Fehlende Wirkung von U73122 auf K _v -Kanäle	53

3.2 Untersuchung verschiedener K ⁺ -Kanäle im heterologen Expressionssystem	54
3.2.1 Vergleich von nativen und transfizierten HEK-Zellen	54
3.2.2 Wirkung von U73122 und U73343 auf GIRK in Whole-Cell-Messungen.....	56
3.2.3 Wirkung von U73122 und U73343 auf GIRK in Einzelkanal-Messungen.....	59
3.2.4 Fehlende Wirkung von U73122 und U73343 auf ROMK (Kir1.1).....	63
3.2.5 Fehlende Wirkung von U73122 und U73343 auf den IRK (Kir2.1).....	65
3.2.6 Fehlende Wirkung von U73122 und U73343 auf KCNQ-Kanäle.....	66
3.2.7 Fehlende Wirkung von U73122 und U73343 auf den IK1-Kanal.....	70
3.2.8 Wirkung von U73122 und U73343 auf den MaxiK	72
3.2.9 Wirkungen von Ba ²⁺ , Tertiapin und NEM auf den MaxiK	73
3.2.10 Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehungen von U73122, U73343 und Bupivacain am MaxiK.....	76
3.2.11 Untersuchung der Ca ²⁺ -Abhängigkeit des U73122-Blocks am MaxiK.....	78
3.2.12 Wirkungen von U73122 und U73343 auf den MaxiK in Einzelkanal-Messungen .	81
3.3 Untersuchung von trunkierten MaxiK im heterologen Expressionssystem	85
3.4 Untersuchung von mutierten IRK- und GIRK-Kanälen im heterologen Expressionssystem	95
3.4.1 Untersuchung des Kir2.1(L222I).....	95
3.4.2 Wirkung des PLC-Aktivators m-3M3FBS auf GIRK und MaxiK.....	97
3.4.3 Untersuchung des Kir3.1/3.2(I232L).....	99
3.4.4 Untersuchung des Kir3.1/3.2 _{Kir2.1-PIP}	101
3.4.5 Untersuchung des Kir3.1 _{G431} und der Chimären Kir3-Kir2.1 und Kir2.1-Kir3	103
4 Diskussion.....	107
4.1 Direkte Wirkung von U73122 auf GIRK und MaxiK.....	108
4.2 Wirkung von U73122 als Porenblocker.....	110
4.3 Wirkung von U73122 auf Cystein-Gruppen	111
4.4 Mögliche Bindungsstellen von U73122.....	112
4.4.1 Wirkung von U73122 auf die Ca ²⁺ -Bindungsstellen des MaxiK.....	113
4.4.2 Wirkung von Bupivacain auf den MaxiK	114
4.4.3 Wirkung von U73122 über die PIP ₂ -Bindungsstelle	114
4.4.4 Wirkung von Bupivacain über die PIP ₂ -Bindungsstelle	117
4.4.5 Wirkung von U73122 auf C-terminal-trunkierte MaxiK	117
4.4.6 Wirkung von U73122 über die Gβγ-Bindungsstelle des GIRK	119
4.5 Mechanistische Wirkung von U73122 auf MaxiK und GIRK	121
4.6 Klinische Bedeutung.....	122
5. Zusammenfassung	124
6. Literaturverzeichnis	126

7. Anhang.....	147
7.1 Materialien.....	147
7.2 Gensequenzen der Wildtyp-Kanäle	151
7.3 Gensequenzen der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte	153
Abkürzungen.....	161
Danksagung	163
Lebenslauf.....	164

1 Einführung

1.1 Phospholipase C und PIP_2

Phosphoinositide sind Inositol-Phospholipide der Zellmembran, die in allen eukaryoten Zellen für die Signalübertragung genutzt werden. Eines dieser Phosphoinositide ist Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat ($PtdIns(4,5)P_2$) oder kurz PIP_2 genannt, das charakteristisch für die Plasmamembran ist (McLaughlin et al., 2002). Es hat drei negative Ladungen und ist das häufigste Isomer von $PtdInsP_2$, obwohl es nur 1-3% der gesamten Membran-Phospholipide ausmacht (Suh & Hille, 2005). PIP_2 wird im endoplasmatischen Retikulum durch Phosphorylierung durch Kinasen synthetisiert und ist an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert. In den 1980er Jahren wurde es als Vorläufer der viel untersuchten Second messenger IP_3 (Inositol(1,4,5)-trisphosphat) und DAG (Diacylglycerol) bekannt, die entstehen, wenn PIP_2 durch die Rezeptor-aktivierte Phospholipase C (PLC) gespalten wird (Abbildung 1.1).

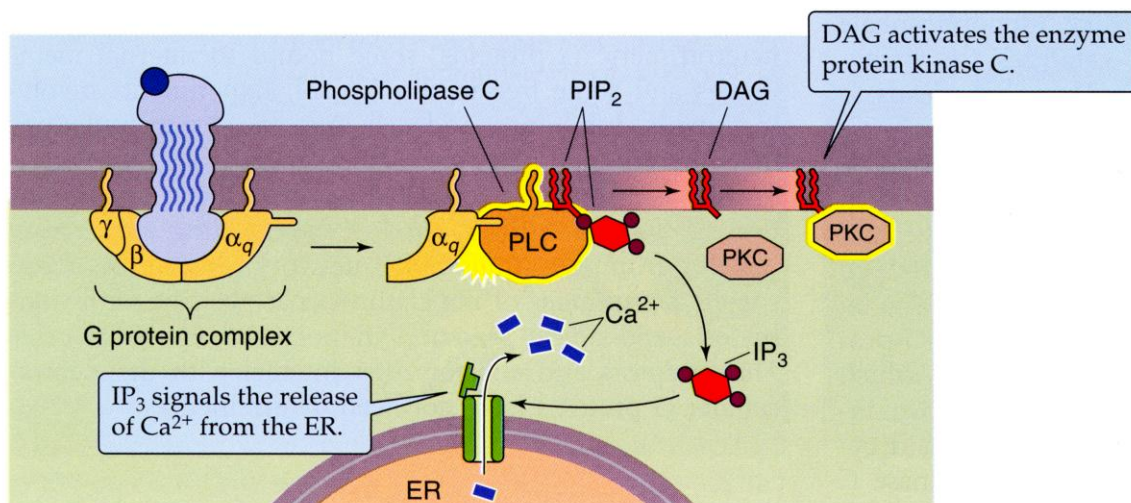


Abbildung 1.1. Rolle der Phospholipase C in den Signal-Wegen.

Bindet ein Ligand an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor, wird die α_q -Untereinheit abgespalten. Diese aktiviert die Phospholipase C (PLC), die wiederum PIP_2 (Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat) in DAG und IP_3 spaltet. DAG (Diacylglycerol) ist membranständig und rekrutiert Enzyme, um sie an der Zellmembran zu verankern. Unter anderem ist es an der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) beteiligt, die Enzyme und Ionenkanäle phosphoryliert und so deren Aktivität beeinflussen kann (Klinke & Silbernagel, 1996; Suh & Hille, 2008; Mizuno & Itoh, 2009). IP_3 (Inositol(1,4,5)-trisphosphat) ist als Second messenger für die Signaltransduktion in der Zelle von großer Bedeutung. Durch Bindung an den IP_3 -Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums (ER) bewirkt es die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER, das als intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher dient. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol. Zytosolisches Ca^{2+} hat viele Funktionen, u. a. bindet es an Calcineurin und Calmodulin. Darüber werden Proteinkinasen aktiviert (z.B. PKC) oder die Aktivität von Ca^{2+} -aktivierten Kanälen beeinflusst (z.B. IK-, MaxiK-Kanal: Klinke & Silbernagel, 1996; Suh & Hille, 2008; Mizuno & Itoh, 2009; Abbildung aus Boron & Boulpaep, 2005).

Die Phospholipase C

Die Phospholipase C ist ein Schlüsselenzym im Phosphoinositol-Stoffwechsel und ist somit zentral an der Signaltransduktion beteiligt. Von der Phospholipase C sind derzeit 14 Isoformen in Säugern identifiziert, die in 5 Subfamilien (PLC- β , $-\gamma$, $-\delta$, $-\zeta$, $-\epsilon$) unterteilt werden. Diese Isoenzyme besitzen alle die Fähigkeit, PIP_2 zu spalten und IP_3 zu formen. Trotzdem wird jedes Isoenzym in seiner Aktivität unterschiedlich durch eine spezifische Kombination von Stimuli reguliert (Rhee, 2001).

Für diese Arbeit besonders interessant ist die β -Isoform, PLC β (4 Isoformen $\beta 1$ - $\beta 4$), weil sie in der Aktivität von Ionenkanälen eine besondere Bedeutung hat. Sie wird durch G-Proteingekoppelte Rezeptoren (G_q -Typ) aktiviert, von denen nach Aktivierung die α_q -Untereinheit abgespalten wird und direkt an die PLC bindet (Abbildung 1.1; Smrcka et al., 1991; Mizuno & Itoh, 2009), aber die PLC β kann auch durch $G\beta\gamma$ -Untereinheiten aktiviert werden (Rhee, 2001; Mizuno & Itoh, 2009).

Studien der letzten Jahre haben ergeben, dass die PLC β , die durch $G\alpha_q$ aktiviert wird, stark Ca^{2+} -abhängig ist und damit einem starken positiven Feedback über ihren eigenen IP_3 -Weg und einer Steigerung des Ca^{2+} -Signal-Weges in anderen Systemen unterworfen ist (Horowitz et al., 2005).

Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat (PIP_2)

Erst in den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass nicht nur die Abbauprodukte IP_3 und DAG die Aktivität von Kanälen modulieren können, sondern dass auch PIP_2 selber ein essentielles Signal-Molekül ist, dessen Bildung oder Abbau in der Plasmamembran eine unmittelbare Auswirkung auf das Schalten verschiedener Ionenkanäle hat (Huang et al., 1998; Sui et al., 1998; Zhang et al., 1999; Logothetis et al., 2007a).

Der erste Ionenkanal, von dem man herausfand, dass er durch PIP_2 reguliert wird, war der K_{ATP} (Kir6) - ein Mitglied der einwärts-gleichrichtenden K^+ -Kanal-Familie (Hilgemann & Ball, 1996; Fan & Makielski, 1997). Mittlerweile umfaßt die Liste der PIP_2 -regulierten Ionenkanäle und Transporter ein beeindruckend breites Spektrum. So sind nicht nur die gesamte Familie der einwärts-gleichrichtenden K^+ -Kanäle (Kir), sondern auch verschiedene andere K^+ -Kanal-Familien wie spannungsabhängige K^+ -Kanäle (K_v), KCNQ, HERG (Human Ether-a-go-go Related Gene channels), two-pore-domain K^+ -channels (K_{2P}), außerdem spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (P/Q- und N- Typ), TRP-Kanäle (Transient Receptor

Potential channels) und der CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) Ziel der PIP₂-Regulation (Hilgemann et al., 2001; Suh & Hille, 2005; 2008). Außerdem wird PIP₂ für die Funktion von Nukleationsproteinen des Zytoskeletts und für die Kontrolle der Endozytose benötigt (siehe Reviews von Hilgemann et al., 2001 und Suh & Hille, 2005).

PIP₂ agiert als lokaler Lipid-Schalter, der zelluläre Aktivitäten reguliert. Durch seine geringe Menge in der Plasmamembran kommt es zu signifikanten Konzentrationsänderungen, sobald die PLC aktiviert wird (Suh & Hille, 2005; 2008).

Für Elektrophysiologen ist besonders die Rolle der PIP₂-Level für die Offenwahrscheinlichkeit von bestimmten Typen von Ionenkanälen interessant (Suh & Hille, 2005). Unter diesen Kanälen sind es die einwärts-gleichrichtenden K⁺-Kanäle der Kir-Familie, die in dieser Arbeit eine besondere Bedeutung haben.

1.2 Für diese Arbeit wichtige Grundlagen der K⁺-Kanäle

K⁺-Kanäle sind die häufigsten und vielfältigsten aller bekannten Ionenkanäle (Sanguinetti & Spector, 1997). Sie kommen sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Zellen vor (Huang et al., 1997). Beim Menschen sind über 50 verschiedene K⁺-Kanal-Gene bekannt. Sie kommen in allen Geweben vor und spielen bei den unterschiedlichsten physiologischen Vorgängen eine wichtige Rolle. Für diese verschiedenen Funktionen existieren unterschiedliche K⁺-Kanäle.

Die K⁺-Kanäle sind strukturell sehr unterschiedlich aufgebaut und werden in drei größere Gruppen unterteilt, welche sich in der Zahl der Transmembrandomänen der α -Untereinheit (2, 4 oder 6 TM) unterscheiden (Abbildung 1.2).

Die erste Gruppe, deren Aufbau die Mindestanforderungen an einen K⁺-Kanal erfüllt, besitzt nur 2 Transmembrandomänen (M1 und M2; Jan & Jan, 1994), wobei sich die Porendomäne zwischen M1 und M2 befindet (Abbildung 1.3B). Diese Gruppe bilden die einwärts-gleichrichtenden K⁺-Kanäle der Kir-Familie (Inwardly rectifying K⁺ channels).

Die zweite und größte Gruppe der K⁺-Kanäle besteht aus 6 Transmembrandomänen (S1-S6), wobei die Pore zwischen S5 und S6 liegt (Abbildung 1.3A). In dieser Gruppe befinden sich mehrere Untergruppen, wie u. a. die große Gruppe der spannungsgesteuerten K_v-Kanäle, die eag- (ether à go-go) Kanäle und die Gruppe der Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanäle. Der MaxiK aus dieser Gruppe besitzt als einziger Kanal eine zusätzliche Transmembrandomäne S0, so dass der N-Terminus extrazellulär liegt (Wallner et al., 1996).

Eine dritte Gruppe bilden K^+ -Kanäle, die erst in den letzten Jahren entdeckt wurden - die sogenannten Two-pore-domain K^+ channels (K_{2P} -Kanäle). Diese K^+ -Kanäle besitzen pro Untereinheit vier Transmembrandomänen und zwei porenbildende Domänen. Funktionelle K_{2P} -Kanäle assemblieren als Dimere, bei denen insgesamt vier Porendomänen eine K^+ -selektive Pore bilden (Abbildung 1.3C; Gurney et al., 2003).

Für diese Arbeit sind die Kanäle der Kir-Familie - insbesondere der Kir3 (GIRK) - und der MaxiK besonders interessant und werden im Folgenden ausführlicher dargestellt.

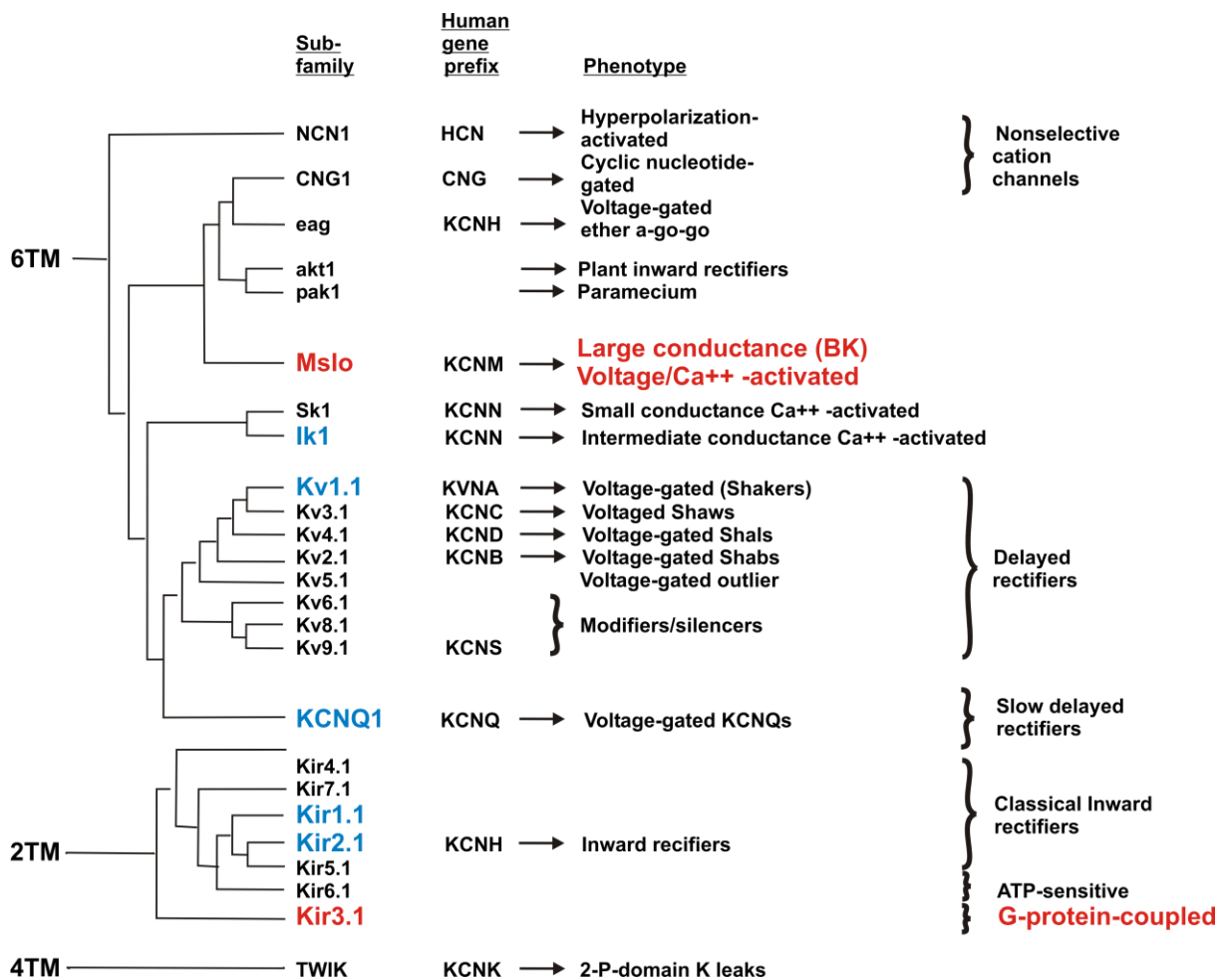


Abbildung 1.2. Übersicht über die Gruppe der K^+ -Kanäle.

Die K^+ -Kanäle werden nach ihrer Struktur in drei größere Gruppen unterteilt, die sich in der Zahl der Transmembrandomänen (6TM, 2TM, 4TM) unterscheiden. Neben der jeweiligen Unterfamilie sind auch die Genbezeichnung am Menschen und der Phänotyp aufgelistet. Die farbig markierten Kanäle wurden in dieser Arbeit untersucht, wobei die rot gekennzeichneten MaxiK („BK“) und Kir3 von zentraler Bedeutung für diese Arbeit sind (Abbildung nach Hille, 2001).

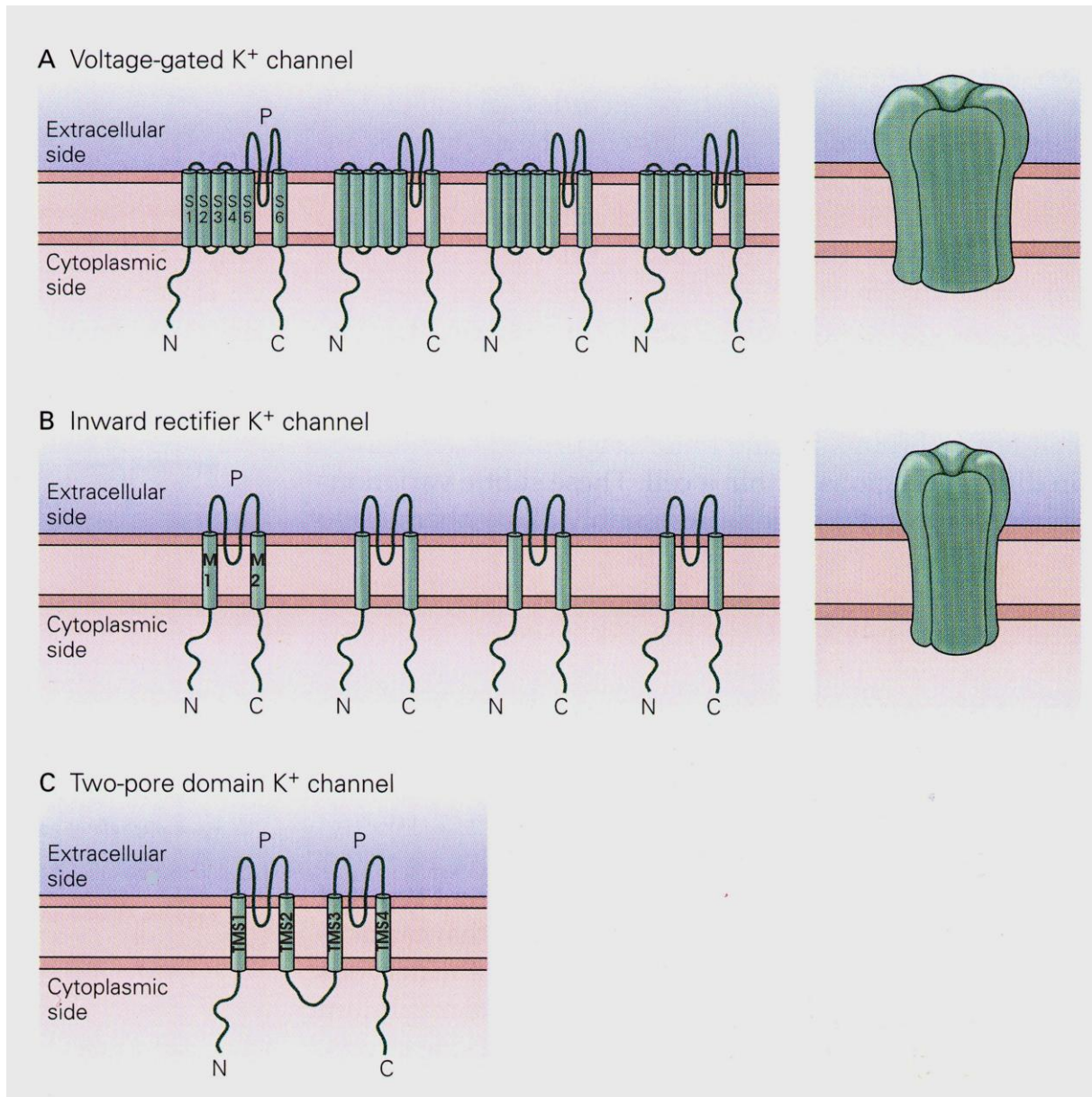


Abbildung 1.3. Schematische Darstellung der Membrantopologie unterschiedlicher K⁺-Kanal α -Untereinheiten.

„P“ bezeichnet den Bereich der Porendomäne und des Selektivitätsfilters, „N“ das N-terminale und „C“ das C-terminale Ende. In den rechten Abbildungen ist jeweils die tetramere Anordnung der α -Untereinheiten zu erkennen (Abbildung nach Kandel et al., 2000).

A) K⁺-Kanäle mit sechs Transmembrandomänen S1-S6 pro α -Untereinheit (spannungsabhängige K⁺-Kanäle). Bei diesen Kanälen befindet sich die Pore zwischen S5 und S6. N- und C-Terminus liegen intrazellulär.

B) K⁺-Kanäle mit zwei Transmembrandomänen M1 und M2 pro α -Untereinheit (einwärtsgerichtete K⁺-Kanäle). N- und C-Terminus liegen intrazellulär.

C) K⁺-Kanäle mit vier Transmembrandomänen TMS1-4 und zwei porenbildenden Domänen pro Untereinheit (two-pore-domain K⁺ channels). Die Kanäle bilden Dimere, so dass insgesamt vier Porendomänen eine Pore bilden.

1.2.1 Die einwärts-gleichrichtenden K⁺-Kanäle

Die einwärts-gleichrichtenden K⁺-Kanäle der Kir-Familie (inwardly rectifying K⁺ channel) sind eine wichtige Gruppe von K⁺-Kanälen, die sich funktionell und strukturell deutlich von den anderen K⁺-Kanälen unterscheiden.

Allen Kanälen aus dieser Familie ist die Eigenschaft einer mehr oder weniger deutlichen Einwärtsgleichrichtung gemeinsam. Das bedeutet, dass diese Kanäle Einwärtsströme negativ vom K⁺-Gleichgewichtspotential (E_K) besser als Auswärtsströme positiv von E_K leiten (Lu, 2004) - ein Prozess, der von Katz (1949) als „abnorme“ Gleichrichtung im Gegensatz zur typischeren Auswärtsgleichrichtung der spannungsgesteuerten K_v-Kanäle bezeichnet wurde. Heute ist aber der Begriff Einwärtsgleichrichtung (inward rectification) gebräuchlich. Die Kir-Kanäle sind nicht absolut spannungsabhängig, sondern die Aktivierung hängt von der Differenz zwischen dem Membranpotential und dem Gleichgewichtspotential für K⁺ (treibende elektromotorische Kraft ($V - E_K$)) ab (Hodgkin & Horowicz, 1959).

Aufgrund ihrer biophysikalischen Eigenschaften spielen die Kir-Kanäle eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials nahe dem K⁺-Umkehrpotential (ca. -90 mV) und der Regulation der Zellerregbarkeit (Hille, 2001; Hibino et al., 2010). Außerdem sind sie beteiligt am K⁺-Transport über Membranen und an der Regulation von Herzfrequenz, Gefäßtonus, Hormonsekretion und der Kontrolle der Salzbalance (Bichet et al., 2003). Sie kommen fast ubiquitär vor. Die Kanäle, die die Zellerregung regulieren, besitzen starke Gleichrichtereigenschaften. Man findet sie v. a. in Neuronen, Herz- und Skelettmuskelzellen. Kir-Kanäle mit schwachen Gleichrichtereigenschaften lassen mehr Auswärtsstrom durch und steuern v. a. den K⁺-Fluß über Epithelien.

Im Moment besteht die Kir-Familie aus mindestens 15 Mitgliedern in Säugern, die in 7 Unterfamilien eingeteilt werden (Kir1-7; Nichols & Lopatin, 1997; Reimann & Ashcroft, 1999). Diese Unterfamilien können aufgrund ihrer Sequenzhomologie, aber auch anhand ihrer funktionellen Eigenschaften wie Stärke der Gleichrichtung und ihrer Antwort auf zelluläre Signale unterschieden werden. Trotz dieser Unterschiede gibt es aber unter all diesen Kanälen der Kir-Familie eine große Sequenz-Konservierung (Nishida & MacKinnon, 2002).

Struktur und Aufbau

Die Röntgenstruktur-Untersuchungen an verschiedenen kristallisierten Kir-Kanälen von MacKinnon ermöglichten in den letzten Jahren neue Einsichten in Architektur, Schaltverhalten und Modulation der Kanäle (Nishida & MacKinnon, 2002; Pegan et al., 2005; Inanobe et al., 2007).

Die Kanäle der Kir-Familie sind kleiner als die K_v -Kanäle. Ihre Sekundärstruktur ist charakterisiert durch nur zwei Transmembran-Helices, genannt TM1 und TM2, die durch das porenformende Segment H5 (Pore-Loop) - in dem auch der Selektivitätsfilter liegt - verbunden werden (Abbildung 1.3B; Ho et al., 1993; Kubo et al., 1993; Dascal et al., 1993; Hibino et al., 2010). TM1 und TM2 einschließlich der Porenregion korrespondieren mit S5 und S6 der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle. N- und C-Terminus liegen intrazellulär und formen eine lange „zytoplasmatische Porenstruktur“ (Nishida & MacKinnon, 2002).

Wie bei den spannungsgesteuerten K^+ -Kanälen wird die Pore aus 4 Untereinheiten gebildet (Yang et al., 1995), dabei kommen in vivo sowohl Homomere (Kir1, 2 und 6) als auch Heteromere (Kir3.1+3.2 im Hirn und Kir3.1+3.4 im Herz) vor. Außer den K_{ATP} -Kanälen (Kir6) assoziieren die Kanäle der Kir-Familie nicht mit β -Untereinheiten wie die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle (Stanfield et al., 2002). Im Gegensatz zur N-terminalen Tetramerisierungs-Domäne der K_v wird die Tetramerisierung bei den Kir von M2 und dem proximalen C-Terminus bestimmt (Tinker et al., 1996; Tinker & Jan, 1999).

Charakteristisch für K^+ -Kanäle wie die der Kir-Familie, denen S4 als Spannungssensor fehlt, ist ihre Eigenschaft, dass sie generell von zytoplasmatischen Liganden und Second messengern, wie G-Proteinen und intrazellulären Nukleotiden, Phosphorylierung und Protonen gesteuert werden (Du et al., 2004).

Die Einwärtsgleichrichtung

Charakteristisch für alle Kir-Kanäle ist die Einwärtsgleichrichtung, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung. Kir2.1 und Kir3.1 sind starke Gleichrichter (Abbildung 1.4C), während andere Kanäle wie Kir1.1 und Kir6.1 nur als schwache Gleichrichter gelten (Hibino et al., 2010). Ursache für die Gleichrichtung sind intrazelluläre di- und polyvalente Kationen wie Mg^{2+} und Polyamine (Spermin⁴⁺ > Spermidin³⁺ > Mg^{2+}), die spannungsabhängig bei Depolarisation den Leitungsweg blockieren und dadurch den K^+ -Auswärtsstrom behindern bzw. hemmen (Lu & MacKinnon, 1994; Lopatin et al., 1994; Fakler et al., 1995).

Dieser Mechanismus ermöglicht den Zellen, intrazellulär K^+ zu konservieren und erleichtert den Eintritt von K^+ -Ionen in die Zelle. Je größer die treibende elektromotorische Kraft ($V - E_K$) in depolarisierender Richtung, desto stärker ist der Porenblock der Kir (Karschin et al., 1997). Ursächlich für diesen Block sind negativ geladene Aminosäuren (Glutamat und Aspartat) im zweiten Transmembransegment entlang der Pore und im cytoplasmatischen C-Terminus (Abbildung 1.4A+B), welche die Affinität für die blockierenden Kationen bestimmen (Lu & MacKinnon, 1994; Nichols & Lopatin, 1997).

Bei Hyperpolarisation ermöglichen die Kir-Kanäle einen Einstrom von K^+ , da in diesem Fall das die Pore blockierende, positiv geladene Molekül den Kanal verlässt.

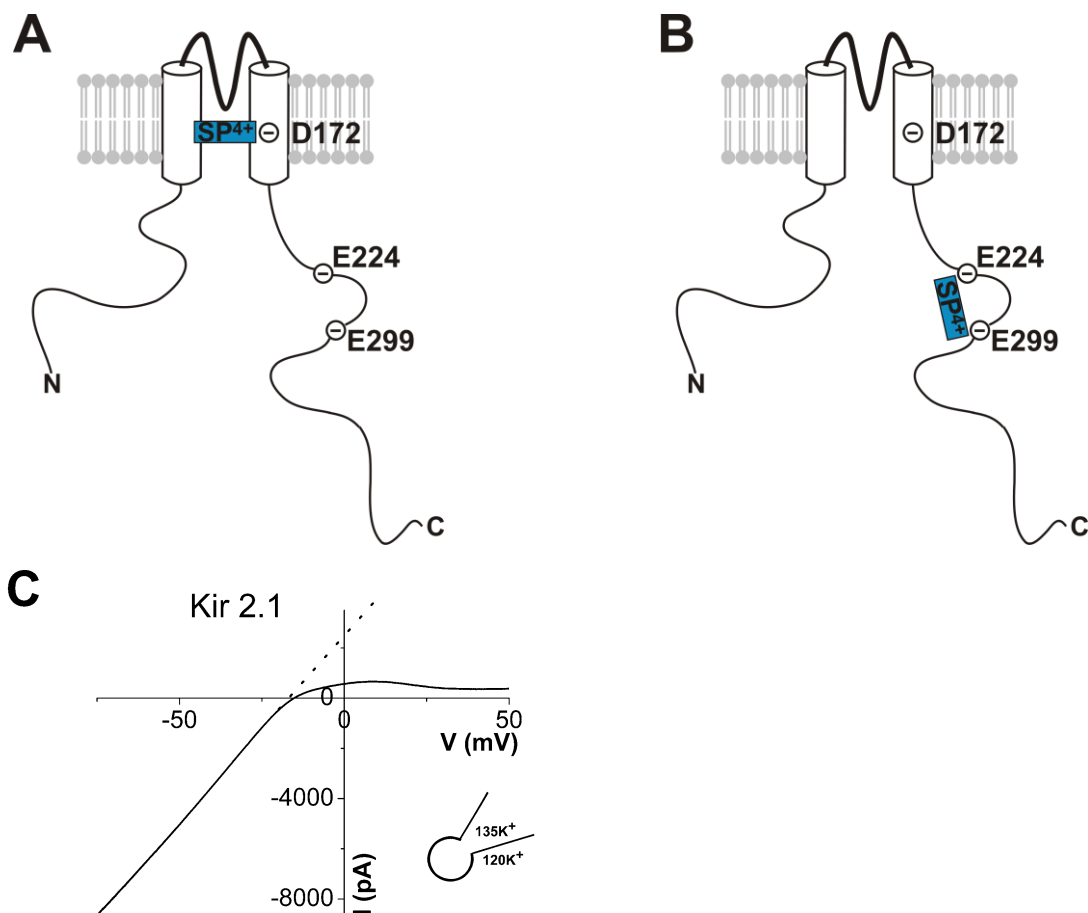


Abbildung 1.4. Einwärtsgleichrichtung bei Kanälen der Kir-Familie.

(A), (B) Modell der Einwärtsgleichrichtung durch Polyamine am Beispiel des Kir2.1. Spermin (SP^{4+}) und Mg^{2+} blockieren die Pore direkt durch Bindung an D172 im zweiten Transmembransegment (A; Lu & MacKinnon, 1994; Hibino et al., 2010). E224 und E299 befinden sich im inneren Vestibulum und dienen als intermediäre Bindungsstelle für Spermin, die den Eintritt von Spermin zur Pore erleichtert, aber bei Bindung von Spermin nicht selber die Pore verstopft (B; Kubo & Murata, 2001; Abbildung nach Prüß, 2004).

(C) I-V-Beziehung des stark einwärts-gleichrichtenden IRK- (Kir2.1) Kanals. Dabei habe ich Spannungsrampen von -75 bis +50 mV (80 mV/s) zum Messen benutzt. Bei zunehmender Depolarisation wird die Pore durch intrazelluläre Kationen - wie in (A) / (B) beschrieben - blockiert, wodurch der Auswärtsstrom gehemmt wird.

Modulation

Die Aktivität der Kir-Kanäle kann durch eine Vielzahl von zellulären Faktoren (Na^+ - und Mg^{2+} -Ionen, ATP (Kir6), G-Proteine (Kir3), PIP_2 , Phosphorylierung, pH-Wert, Arachidonsäure, Oxidation / Reduktion) beeinflusst werden (Reimann & Ashcroft, 1999; Ruppertsberg, 2000; Hibino et al., 2010). Charakteristisch für die gesamte Kir-Familie ist aber ihre Regulation durch PIP_2 (siehe Abschnitt 1.2.2; Hilgemann & Ball, 1996; Shyng & Nichols, 1998; Zhang et al., 1999). Beim Kir1 und Kir2 ist PIP_2 z.B. für die konstitutive Aktivität nötig (Liou et al., 1999; Zhang et al., 1999), beim Kir3 wird es benötigt für die normale Aktivierung des Kanals durch $\text{G}\beta\gamma$ -Untereinheiten und Na^+ (Huang et al., 1998; Zhang et al., 1999; Ho & Murrell-Lagnado, 1999) und beim Kir6 reguliert es die ATP-Affinität (Shyng & Nichols, 1998; 2000).

Aktivierung durch PIP_2

Die Aktivierung durch Phosphoinositide wie PIP_2 ist eine gemeinsame Eigenschaft aller Kir-Kanäle (Sui et al., 1998; Huang et al., 1998; Du et al., 2004), wobei sich die verschiedenen Mitglieder der Familie allerdings in ihrer Affinität und Spezifität für die Phosphoinositide unterscheiden (siehe Abschnitt 4.4.3; Rohacs et al., 2003; Du et al., 2004).

Eine direkte Interaktion zwischen negativ geladenen Phosphat-Kopfgruppen von PIP_2 und positiv geladenen Resten im N- und C-Terminus der Kanäle ist essentiell für ihre Aktivierung (Fan & Makielski, 1997; Huang et al., 1998; Lopes et al., 2002; Schulze et al., 2003). Basierend auf ihrer Stelle in den zytoplasmatischen Regionen des Kanals können die Reste, die zur PIP_2 -Interaktion beitragen, in zwei Gruppen unterteilt werden. Eine Gruppe ist direkt neben dem inneren Falblatt der Plasmamembran angeordnet und interagiert wahrscheinlich direkt mit PIP_2 . Die zweite Gruppe befindet sich weiter entfernt von der Membran und beeinflusst die PIP_2 -Interaktion allosterisch (Xie et al., 2007). Diese Bindung stabilisiert die TM2-Helix in einer Offen-Konfiguration, so dass der Selektivitätsfilter öffnen und schließen kann. Längeres spontanes Öffnen und Schließen beobachtet man beim Kir2.1 (Choe et al., 1999; Lu et al., 2001), während man beim GIRK und K_{ATP} kurzes Öffnen und Schließen beobachten kann (Trapp et al., 1998; Enkvetchakul et al., 2000; Yakubovich et al., 2000).

In letzter Zeit häufen sich Hinweise, die der PIP_2 -Kanal-Interaktion eine besondere co-regulatorische Rolle zuordnen. Es wurde gezeigt, dass die Bindung von einigen Kanal-Modulatoren eine erhöhte PIP_2 -Affinität des Kanals verursacht, was zu einer Stabilisierung seines Offen-Zustands führt - wie im Fall von G-Proteinen, Na^+ und PKA (Huang et al., 1998;

Zeng et al., 2003a). Auf der anderen Seite reduzieren andere Kanalmodulatoren die PIP₂-Affinität - wie z.B. ATP und pH - wodurch der Kanal in seinem Geschlossen-Zustand stabilisiert wird (Baukrowitz et al., 1998; Schulze et al., 2003; siehe auch Reviews von Xie et al., 2007 und Guy-David & Reuveny, 2007).

Während PIP₂ unmittelbar die Kir-Aktivität und das Gating reguliert (Xie et al., 2007), tragen diverse Co-Faktoren zur Kanal-Regulation bei, indem sie die Kanal-PIP₂-Interaktion modulieren. Viele dieser Co-Faktoren interagieren mit Bereichen, die in der Nähe von PIP₂-sensitiven Stellen des Kanals liegen.

1.2.2 Für diese Arbeit wichtige Kir-Unterfamilien und die Modifikation der Kanal-PIP₂-Bindungsaffinität durch Co-Faktoren

Der IRK- (Kir2) Kanal

Der IRK (Kir2) war der erste bekannte, „klassische“, stark einwärts-gleichrichtende Kanal. Durch eine hohe PIP₂-Affinität ist er konstitutiv aktiv. In Herzzellen ist der IRK1 für die Bildung des einwärts-gleichrichtenden Stroms (I_{K1}) verantwortlich, der zu einer Repolarisation in der Endphase des Aktionspotentials führt und eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials spielt (Miake et al., 2003; Hibino et al., 2010). Bisher besteht die Kir2-Unterfamilie aus 4 Mitgliedern (Kir2.1-4; Gutman et al., 2003; Kubo et al., 2005). Sie kontrollieren das Ruhemembranpotential in vielen verschiedenen Zelltypen und sind wichtig für elektrische Aktivität in Herz, Nervensystem und Muskeln (Nichols & Lopatin, 1997; Stanfield et al., 2002).

Die Aktivität der IRK1 hängt nur von der Anwesenheit von PIP₂ in der Membran ab (Zhang et al., 1999). Aber auch sie können in ihrer Aktivität durch verschiedene Zellprozesse reguliert werden - wie z.B. den pH. Außerdem werden sie gehemmt durch PKA-, PKC- und Tyrosinkinase-abhängige Phosphorylierung (Fakler et al., 1994; Wischmeyer & Karschin, 1996; Wischmeyer et al., 1998). Des Weiteren können sie von Polyaminen in ihrer Aktivität moduliert werden. Lange Polyamine sind in der Lage, den Kanal in einer Offen-Konfiguration zu stabilisieren, indem sie einen deutlichen Anstieg der Kanal-PIP₂-Bindungsaffinität ermöglichen. So dienen lange Polyamine in einer doppelten Rolle sowohl als Blocker als auch als Co-Aktivatoren (zusammen mit PIP₂) der IRK1 (Xie et al., 2005).

Das Andersen-Syndrom, bestehend aus der Trias periodische Paralyse, ventrikuläre Arrhythmien und muskuloskeletale Dismorphien (Tawil et al., 1994; Venance et al., 2006), ist auf eine Mutation, die die PIP₂-Sensitivität verändert, zurückzuführen (Lopes et al., 2002). Durch diese Mutation ist die Aktivität der Kanäle herabgesetzt, wodurch das Ruhemembranpotential nicht mehr aufrechterhalten werden kann und es zu Depolarisationen der Muskelfasermembran kommen kann. In diesem Zustand ist die Muskelfasermembran unerregbar, woraus die Lähmung resultiert (Hibino et al., 2010). Da das Gen nicht nur im Skelettmuskel, sondern auch im Herzmuskel exprimiert wird, können neben periodischen Paralysen auch im lähmungsfreien Intervall ventrikuläre Arrhythmien auftreten (Tawil et al., 1994; Andelfinger et al., 2002; Venance et al., 2006).

Der GIRK- (Kir3) Kanal

Die Kir3-Unterfamilie wird auch als GIRK-Familie (G-Protein-gekoppelte einwärts-gleichrichtende K⁺-Kanäle) bezeichnet, da sie durch direkte Interaktion mit (Pertussistoxin-sensitiven) G-Proteinen aktiviert werden. Inzwischen sind 4 Mitglieder in Säugern bekannt (Kir3.1-3.4; Dascal et al., 1993; Kubo et al., 1993), die sich am deutlichsten im Bereich von N- und C-Terminus voneinander unterscheiden. GIRK-Kanäle findet man in vielen verschiedenen Zellen, am Herz, im ZNS und PNS und in endokrinen Geweben, wo sie die Hormonsekretion kontrollieren (Stanfield et al., 2002).

In vivo können Kir3.2 und Kir3.4 wahrscheinlich auch Homotetramere bilden (Corey & Clapham, 1998; Inanobe et al., 1999), allerdings bestehen die typischen GIRK-Ströme aus Heterotetrameren - und zwar im Hirn aus Komplexen von Kir3.1 und Kir3.2 (Kobayashi et al., 1995; Karschin et al., 1996) und am Herzen von Kir3.1 und Kir3.4 (Dascal et al., 1993; Krapivinsky et al., 1995). In den kardialen Vorhofzellen (Schrittmacherzellen) bilden die beiden Kanäle den sog. K_{ACh}-Kanal (atrial acetylcholine-activated K⁺ channel), der dafür zuständig ist, nach Vagusstimulation die Herzfrequenz zu verlangsamen. Indem die K⁺-Permeabilität erhöht wird, läuft die diastolische Depolarisation verlangsamt ab, wodurch wiederum die Schwelle für die Neuerregung später erreicht wird (Klinke & Silbernagel, 1996; Stanfield et al., 2002). In verschiedenen Hirnregionen vermitteln die GIRK hemmende Neurotransmitter-Wirkungen und unterliegen den langsamen - durch GABA_B-Rezeptoren vermittelten - inhibitorischen postsynaptischen Potentialen (Stanfield et al., 2002).

Die GIRK sind zentrale Elemente, um die Zellerregbarkeit zu kontrollieren (Dascal, 1997). Ihre Aktivität wird durch viele Transmitter-Systeme reguliert - am Herzen u. a. über den M2-Rezeptor (ACh-Rezeptor; Stanfield et al., 2002). Die neuronalen GIRK werden durch diverse

Neurotransmitter und -modulatoren aktiviert (z.B. GABA (via GABA_B-Rezeptor), Adenosin, ACh, Dopamin, Serotonin, einige Opiode, Somatostatin), wodurch die neuronale Erregbarkeit über eine Zellhyperpolarisation gedämpft wird (Dascal, 1997). Kommt es zum Verlust der erregungsbegrenzenden GIRK-Aktivität, resultiert eine erhöhte Epileptizität (Signorini et al., 1997). Mäuse denen das Kir3.2-Gen fehlt (sog. Weaver-Mäuse) leiden unter Krampfanfällen und Gleichgewichtsstörungen (Signorini et al., 1997).

Typisch für den GIRK ist die sogenannte Desensibilisierung, d.h. nach Applikation eines Aktivators wie Serotonin kommt es nach einer initialen Aktivierung (Anstieg des Ionenstroms) wieder zu einer Stromabnahme (siehe Abschnitte 3.1.1, 3.2.2). Dieses Phänomen findet man nicht nur beim GIRK, sondern auch bei anderen liganden-gesteuerten Kanälen. Desensibilisierung findet mit zwei Zeitkonstanten statt, einer schnellen Komponente mit einer Zeitkonstante von wenigen Sekunden, während die langsame Komponente innerhalb von 1-2 Minuten nach Aktivierung auftritt (Sickmann & Alzheimer, 2002; 2003; Leaney et al., 2004). Die Desensibilisierung korreliert mit der Agonisten-Konzentration (Leaney et al., 2004) und bedeutet eine Abschwächung der Stromantwort bei andauernder Stimulierung des Rezeptors. Es scheint ein Sicherheitsmechanismus zu sein, der zu große und langandauernde Aktivierungen verhindert.

Modulierung des GIRK durch PIP₂

Die Kir3-Familie interagiert nur sehr schwach mit PIP₂ und ist daher besonders empfänglich für ein hohes Maß an Modulation. Die Aktivität des GIRK ist abhängig vom Zusammenspiel diverser Modulatoren wie der βγ-Untereinheit des G-Proteins, intrazellulärem Na⁺ und Mg²⁺, Protein-Phosphorylierung durch PKA, PKC und Tyrosinkinasen und Hydrolyse von PIP₂ durch PLCβ und PLCγ (Petit-Jacques et al., 1999; Xie et al., 2007; Logothetis et al., 2007b).

Studien haben gezeigt, dass sowohl Gβγ als auch intrazelluläre Na⁺-Ionen den GIRK nur aktivieren können, wenn die Kanäle vorher durch PIP₂ modifiziert waren (Sui et al., 1998). Sie scheinen ihre Wirkung auszuüben, indem sie die Interaktion des Kanals mit PIP₂ stabilisieren (Huang et al., 1998; Zhang et al., 1999; Ho & Murrell-Lagnado, 1999; Logothetis & Zhang, 1999).

Regulierung des GIRK durch G $\beta\gamma$

Die GIRK werden über viele Transmittersysteme aktiviert (Stanfield et al., 2002). Die Bindung verschiedener Transmitter an den entsprechenden (Pertussistoxin-sensitiven) G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) aktiviert ein G-Protein. G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten - α , β und γ - wobei ein GDP an die α -Untereinheit gebunden ist. Bindet ein Ligand an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor, wird am G-Protein vom i/o-Typ das GDP gegen GTP ausgetauscht. Dies verursacht ein Abdissoziieren der $\beta\gamma$ -Untereinheit, die an den Kanal bindet (Abbildung 1.5). Die α -Untereinheit hat intrinsische GTPase-Aktivität, so dass GTP langsam zu GDP hydrolysiert wird und die drei Untereinheiten wieder reassoziieren können (Stanfield et al., 2002; Mizuno & Itoh, 2009; Hibino et al., 2010). Bunemann et al. (2003) gehen allerdings davon aus, dass es nicht zu einer Dissoziation der $\beta\gamma$ - von der α -Untereinheit kommt, sondern lediglich zu einer Konformationsänderung (Rearrangement) des G-Proteins.

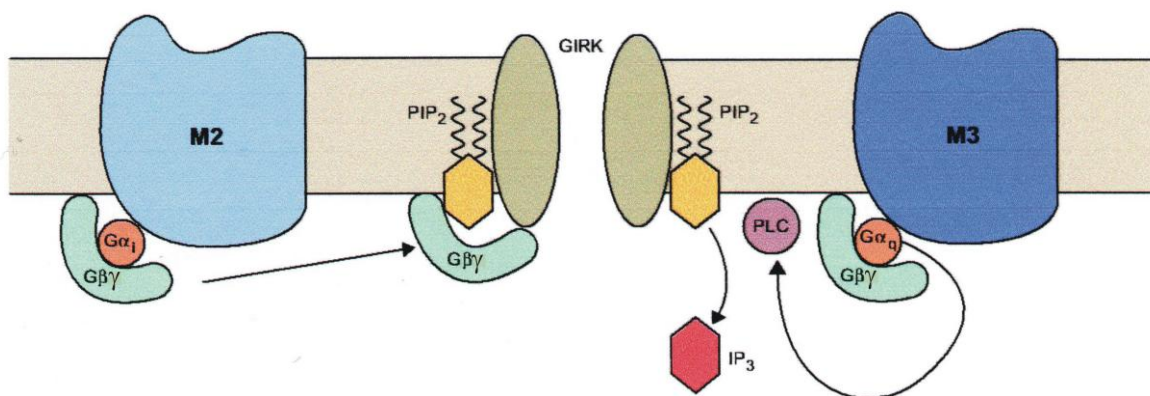


Abbildung 1.5. Aktivierung und Hemmung der GIRK über verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) am Beispiel der cholinergen Modulation.

Wenn Acetylcholin an den M2-Rezeptor bindet, wird das G-Protein (i/o-Typ) aktiviert und die $\beta\gamma$ -Untereinheit abgespalten. Diese bindet an den GIRK und stabilisiert die Interaktion von PIP₂ mit dem Kanal. Dadurch wird der Kanal aktiviert und die Offenwahrscheinlichkeit nimmt zu. Bindet Acetylcholin an den M3- oder den M1-Rezeptor, wird vom G-Protein (q-Typ) die α_q -Untereinheit abgespalten, die die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Die PLC hydrolysiert PIP₂, wodurch die Offenwahrscheinlichkeit abnimmt (Abbildung nach Jan & Jan, 2000).

Die G-Proteine können Ionenkanäle indirekt über verschiedene Second-messenger-Signalwege oder direkt über membranbegrenzte Signalwege modulieren. Ein Beispiel für das letztere ist die G $\beta\gamma$ -Regulation der Kir3-Kanäle (Abbildung 1.5).

Es ist allgemein akzeptiert, dass für die G-Protein-Modulation des Kanals eine direkte Interaktion der $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins mit dem zytosolischen N- und C-Terminus des

GIRK notwendig ist (Slesinger et al., 1995; Huang et al., 1997; Ivanina et al., 2003). In den späten 1990er Jahren kam die Erkenntnis hinzu, dass $G\beta\gamma$ den Kir3.1/3.4-Kanal nicht ohne die Anwesenheit von PIP_2 aktivieren kann (Sui et al., 1998; Huang et al., 1998; Stanfield et al., 2002). Dies lässt auf eine funktionelle Abhängigkeit des G-Protein-Signals vom Membranphospholipid PIP_2 schließen.

Bisher wurden vier $G\beta\gamma$ -Protein-Bindungsregionen am GIRK im N- und C-Terminus lokalisiert (Ivanina et al., 2003; Finley et al., 2004; Logothetis et al., 2007b). Die $G\beta\gamma$ -Bindung scheint eine Konformationsänderung im C-Terminus zu begünstigen, was die Struktur der PIP_2 -Bindungsregion allosterisch verändert. Dadurch ist $G\beta\gamma$ in der Lage, die Kanal- PIP_2 -Interaktion zu stabilisieren, was zu ausgeprägter Kanal-Aktivität führt (Xie et al., 2007).

Regulierung des GIRK durch die PLC

Die GIRK können durch verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nicht nur hoch-, sondern auch herunterreguliert werden, wobei letzteres über die α -Untereinheit von G-Proteinen vom q/11-Typ erfolgt.

Wird z.B. ein M1-, M3- oder α_1 -adrenerger Rezeptor aktiviert (Abbildung 1.5; Meyer et al., 2001; Cho et al., 2001), so wird die α_q -Untereinheit des G-Proteins abgespalten, die die PLC aktiviert. Diese hydrolysiert PIP_2 , so dass es zu einer Abnahme der PIP_2 -Konzentration in der Membran und damit zu einer Abnahme der Aktivität des GIRK kommt (Stauffer et al., 1998; Willars et al., 1998; Cho et al., 2001).

Für eine dynamische Steuerung der Zell-Erregbarkeit kann der GIRK über verschiedene GPCR hoch- bzw. herunterreguliert werden, abhängig vom Gleichgewicht aus der $G_{i/o}$ -Protein-assoziierten Freisetzung von $G\beta\gamma$ -Untereinheiten und der G_q -Protein-assoziierten Aktivierung der PLC mit nachfolgender PIP_2 -Verarmung (Lei et al., 2003). Diese bidirektionale Regulation wurde sowohl in atrialen Myozyten (Braun et al., 1992; Yamaguchi et al., 1997) als auch in aminergen Hirnstammneuronen (Velimirovic et al., 1995; Farkas et al., 1997) beschrieben. Die Hemmung über die GPCR ist unabhängig von PKC, IP_3 und intrazellulärem Ca^{2+} (Lei et al., 2003).

Modulierung des GIRK durch Na^+

Intrazelluläre Na^+ -Ionen können den GIRK über einen G-Protein-unabhängigen Mechanismus aktivieren (Ho & Murrell-Lagnado, 1999; Zhang et al., 1999; Petit-Jacques et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass Na^+ - das sowohl den Kir3.2 (Ho & Murrell-Lagnado, 1999)

als auch den Kir3.4 aktiviert (Sui et al., 1998; Zhang et al., 1999) - an ein Aspartat im proximalen C-Terminus von Kir3.2 und Kir3.4 bindet, welches in der Nähe der PIP₂-Bindungsstelle liegt (Zhang et al., 1999; Hibino et al., 2010). Durch die direkte Interaktion mit diesem negativ geladenen Aspartat wird das negative Potential in der Umgebung der PIP₂-Bindungsstelle reduziert, wodurch die Affinität des Kanals für PIP₂ erhöht und die Kanal-PIP₂-Interaktion stabilisiert wird (Logothetis & Zhang, 1999; Ho & Murrell-Lagnado, 1999).

ATP und Phosphorylierung

ATP hat neben G $\beta\gamma$ und Na⁺ eine zusätzliche positive Wirkung auf die Offenwahrscheinlichkeit. Es muss genügend intrazelluläres ATP vorhanden sein, um durch seine Hydrolyse PIP₂ synthetisieren zu können (Sui et al., 1998; Huang et al., 1998) und dadurch den Kanal offen zu halten. Eine weitere Aufgabe von ATP besteht darin, den verschiedenen Kinasen zur Phosphorylierung zur Verfügung zu stehen. Die PKA z.B. erhöht durch Phosphorylierung die Affinität für PIP₂ und aktiviert dadurch den Kanal (Lopes et al., 2007). Die PKC dagegen hemmt den Kanal, indem sie seine Affinität für PIP₂ reduziert (Logothetis et al., 2007b).

PIP₂ spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Offenwahrscheinlichkeit der GIRK-Kanäle. Trotzdem kann es den Kanal nicht alleine aktivieren. Es scheint vielmehr als Endkontrollpunkt verschiedener Signalwege zu dienen und so letztendlich für die Aktivität der Kir-Kanäle und das Gating verantwortlich zu sein (Xie et al., 2007).

1.2.3 Die Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanäle

Die Familie der Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanäle ist eine strukturell und funktionell unterschiedliche Gruppe von Ionenkanälen mit der Gemeinsamkeit, dass sie durch den Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration aktiviert wird. Die Kanäle kommen in fast allen Zellen des Menschen vor und spielen eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Form des Aktionspotentials und der Regulierung der Zell-Erregbarkeit, indem sie zur Repolarisation und After-Hyperpolarisation beitragen (Robitaille & Charlton, 1992; Ashcroft, 2000). Außerdem beeinflussen sie Differenzierungsvorgänge, Proliferation, Sekretionsvorgänge und die Erregbarkeit und Kraftgenerierung glatter Muskulatur (Kaczorowski et al., 1996; Hille, 2001).

Eine Hauptaufgabe liegt darin, eine Verbindung zwischen dem Ca^{2+} -basierten Second-messenger-System und der elektrischen Aktivität der Zellen herzustellen (Jensen et al., 2001).

Innerhalb der Familie der Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle werden hinsichtlich ihrer Einzelkanalleitfähigkeiten zwei Hauptgruppen unterschieden (Wei et al., 2005): Zur ersten Gruppe gehört der MaxiK, oder BK (= „big K“), der so genannt wird wegen seiner großen Einzelkanalleitfähigkeit (100 - 250 pS in symmetrischen K^+ -Konzentrationen). Er wird sowohl durch Depolarisation als auch durch intrazelluläre mikromolare Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert. Zur zweiten Gruppe gehören der SK (= „small K“) mit einer Einzelkanalleitfähigkeit von 4 - 20 pS und der IK (= „intermediate K“) mit einer Einzelkanalleitfähigkeit von 20 - 80 pS. Beide Kanäle sind kaum spannungssensitiv und aktivieren schon durch Ca^{2+} -Konzentrationen im submicromolaren Bereich (Ashcroft, 2000). Im Gegensatz zum SK und IK - die wie die K_v -Kanäle 6 TM-Domänen haben - besitzt der MaxiK eine 7-teilige Transmembranstruktur. Außerdem ist die Aminosäuresequenz der beiden Gruppen nur entfernt verwandt und auch funktionell und pharmakologisch unterscheiden sie sich deutlich (Wallner et al., 1996; Vergara et al., 1998).

1.2.4 Der MaxiK

Der MaxiK-Kanal ist einer der am weitesten verbreiteten K^+ -Kanäle in Säugern und kommt in nahezu allen Zelltypen mit Ausnahme der Herz-Myozyten vor. Indem er eine Membranhypolarisation verursacht, trägt er zur Repolarisation bei. Außerdem spielt er eine wichtige Rolle in der neuronalen Erregbarkeit, in der Transmitter-Freisetzung (Kaczorowski et al., 1996; Sun et al., 2004), in der Kontraktion von glatter und Skelettmuskulatur (Brenner et al., 2000b; Wellman & Nelson, 2003) und im Immunsystem (Ahluwalia et al., 2004).

Der MaxiK in der glatten Gefäßmuskulatur ist entscheidend an der Repolarisation der glatten Muskelzellen und der Beendigung des Ca^{2+} -Einstromes während der Vasokonstriktion beteiligt. Damit spielt er eine Schlüsselrolle in der Kontrolle des systemischen Blutdrucks (Nelson et al., 1995) und der Regulierung des Lumens von Luftwegen (Garcia-Calvo et al., 1994), Gastrointestinal-Trakt (Vogalis et al., 1996) und Blase (Heppner et al., 1997). Man findet die MaxiK auch in Nervenzellen, wo sie in erster Linie für eine schnelle Repolarisation bzw. Hyperpolarisation verantwortlich sind und an der Transmitterfreisetzung am Axonterminale beteiligt sind (Robitaille et al., 1993; Sun et al., 2004).

Im Gegensatz zum IK ist für den MaxiK - in Übereinstimmung mit seiner Sequenzhomologie - die Spannung für die Aktivierung deutlich wichtiger als Ca^{2+} (Stefani et al., 1997; Vergara et al., 1998; Moss & Magleby, 2001). Stattdessen handelt Ca^{2+} als Modulator und ist in der Lage, die benötigte Energie zum Öffnen des Kanals zu reduzieren, was aus der Verschiebung der Aktivierungsspannung der Kanäle hin zu negativen Potentialen abgeleitet werden kann (Schreiber & Salkoff, 1997; Shi et al., 2002). Für eine nennenswerte Aktivierung des Kanals unter physiologischen Bedingungen sind aber sowohl Depolarisation als auch erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} nötig. Dies zeigt die Abbildung 1.6, die zwei Whole-Cell-Messungen einer HEK239-Zelllinie, die stabil mit der MaxiK α - und β 1-Untereinheit transfiziert war, darstellt.

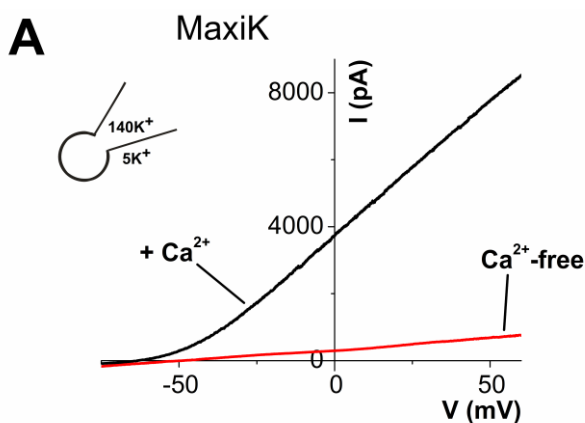


Abbildung 1.6. Ca^{2+} -Abhängigkeit der MaxiK-Kanäle.

Diese Whole-Cell-Messungen wurden an HEK293-Zellen, die stabil mit der MaxiK α - und β 1-Untereinheit transfiziert waren, durchgeführt. Es wurden Spannungsrampen von -100 bis +60 mV erzeugt (20 mV/s). Dabei wurden zwei verschiedene Pipettenlösungen verwendet, eine EGTA-gepuffert, weitgehend ohne freies Ca^{2+} (rot), während die andere $300\mu\text{M}$ Ca^{2+} enthielt (schwarz). Die K^+ -Konzentrationen von Bad- und Pipettenlösung sind im Inset abgebildet.

Die Messung der roten Kurve in Abbildung 1.6 wurde mit einer Standard-Pipettenlösung durchgeführt. Der Kanal wurde nicht aktiviert und produzierte dementsprechend kaum Strom. Das liegt daran, dass in der Pipettenlösung EGTA vorhanden war, das Ca^{2+} abpuffert. Erst wenn in der internen Lösung genügend Ca^{2+} enthalten war (die Pipettenlösung enthielt $300\mu\text{M}$ Ca^{2+}) - wie in der schwarzen Kurve - konnte der Kanal aktiviert werden. Dabei zeigten die MaxiK eine starke auswärts-gleichrichtende Strom-Spannungs-Beziehung, d.h. bei negativen Spannungen zeigten die Kanäle keinen Strom, der dann aber typischerweise

zwischen -30 and +30 mV aktiviert wurde und bei weiterer Depolarisation immer weiter anstieg (E_K -88 mV).

Da Ca^{2+} für die Aktivierung des MaxiK eine so große Rolle spielt, ist es wichtig, die freie Ca^{2+} -Konzentration in der Pipettenlösung genau zu bestimmen. Dies geschieht mit Hilfe von Ca^{2+} -Elektroden (siehe Abschnitt 2.5).

Nach MaxiK-Aktivierung hyperpolarisiert der resultierende K^+ -Strom die Zelle und beendet den Ca^{2+} -Einstrom, indem er spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle schließt (Schreiber et al., 1999). Auf diese Weise werden die MaxiK zum negativen Feedback-Regulator des Ca^{2+} -Eintritts. Durch die duale Steuerung der Kanäle sowohl durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration als auch durch das Membranpotential, schaffen die MaxiK eine Verbindung zwischen dem metabolischen und dem elektrischen Zustand der Zellen und werden dadurch zu wichtigen Steuerungseinheiten vieler Signalprozesse (Toro et al., 1998).

Struktur und Aufbau

Die Grundeinheit des MaxiK-Kanals ist ein Homotetramer aus der porenformenden α -Untereinheit, die auch alleine exprimiert werden kann, und einer β -Untereinheit im Verhältnis 1:1. Je nach Gewebe kann die α -Untereinheit mit verschiedenen regulatorischen β -Untereinheiten assoziieren (Kaczorowski et al., 1996; Toro et al., 1998). Anhand seiner Primärsequenz gehört der MaxiK zur Superfamilie der spannungsabhängigen K^+ -Kanälen (Jan & Jan, 1997). Allerdings besitzt er strukturelle und funktionelle Besonderheiten, die in molekularen Studien der letzten Jahre entdeckt wurden (siehe Reviews von Magleby, 2003, Lu et al., 2006 und Ghatta et al., 2006).

Die Primärsequenz der Transmembran-Segmente S1-S6 weist eine ausgeprägte Homologie zu den korrespondierenden Regionen der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle auf. Genau wie die K_v enthält auch der MaxiK die TM-Segmente S1-S6 und einen typischen P-Loop, der S5 und S6 miteinander verbindet und die Kanalpore mit Selektivitätsfilter bildet (Abbildung 3.19; Jan & Jan, 1997). Der P-Loop enthält auch den Rezeptor für die Bindung der Porenblocker Iberitoxin (IbTX) und Charybdotoxin (ChTX). Wie bei allen anderen spannungsabhängigen K^+ -Kanälen ist das S4-Segment durch einen hohen Anteil an positiv geladenen Aminosäuren gekennzeichnet, die weitestgehend für den intrinsischen Spannungssensor verantwortlich sind (Ghatta et al., 2006).

Zusätzlich besitzt der MaxiK ein 7. hydrophobes Segment S0, das einzigartig für diesen Kanal ist, und das zu einem extrazellulären N-Terminus führt (Wallner et al., 1996). Der N-Terminus agiert als Bindungsstelle für die β -Untereinheiten (Wallner et al., 1996). Eine weitere Besonderheit des MaxiK ist der sehr lange intrazelluläre C-Terminus, der mehr als die Hälfte des gesamten Proteins umfasst und vier weitere hydrophobe Segmente (S7-10) enthält (Abbildung 3.19; Ghatta et al., 2006).

Innerhalb dieses C-Terminus befinden sich beim MaxiK zwei RCK-Domänen (Regulator of Conductance for K⁺). Diese Domänen sind in den meisten K⁺-Kanälen vorhanden und bilden Bereiche, in denen verschiedene Modulatoren binden und so die K⁺-Leitfähigkeit regulieren. Jiang et al. (2001) haben diese RCK-Domäne am KcsA K⁺-Kanal von *E. coli* untersucht und festgestellt, dass sie im verwandten eukaryoten MaxiK bis auf wenige Aminosäuren konserviert ist (RCK1) und eine wichtige Rolle im Schaltmechanismus, v. a. als Ca²⁺-Bindungsstellen, spielt (s. u.; Jiang et al., 2001).

Nach seiner Sequenz kann der MaxiK in drei verschiedene Regionen unterteilt werden (Schreiber et al., 1999): Eine „Core“-Region, die den spannungsabhängigen K⁺-Kanälen der Shaker-Familie ähnelt und aus den Transmembran-Segmenten S0-S6 und einer intrazellulären RCK1-Domäne besteht (Jiang et al., 2001), einer nicht-konservierten Linker-Region und der „Tail“-Domäne, die das letzte Drittel des C-Terminus umfasst und die Transmembran-Segmente S9 und S10 enthält (Abbildung 3.19). Sie bildet eine mögliche zweite RCK-Domäne (Abbildung 3.19; Magleby, 2003). Während Core- und Tail-Region unter den MaxiK der verschiedenen Spezies hoch konserviert sind, ist der Linker sowohl in Sequenz als auch in Länge hoch variabel (Wei et al., 1994).

Der gesamte C-Terminus enthält multiple regulatorische Angriffsstellen, z.B. die Tetramerisierungsregion, den Ca²⁺-Bowl, einige Leucin-Zipper-Domänen für Protein-Protein-Interaktionen (Tian et al., 2003) und multiple Phosphorylierungsstellen für cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen (Zhou et al., 2001b) und für PKC und Tyrosinkinase (Wang et al., 1999).

Ca²⁺-Bindungsstellen

Der MaxiK enthält multiple Bindungsstellen für zweiwertige Kationen, die intrazellulärem Ca²⁺ und Mg²⁺ erlauben, den Kanal zu aktivieren (Hu et al., 2006).

Schreiber & Salkoff (1997) identifizierten die erste hoch affine Ca²⁺-Bindungsstelle (High-Affinity-Ca²⁺-Site) am MaxiK, die Ca²⁺-Bowl. Sie befindet sich in der Tail-Domäne im

C-Terminus kurz vor S10. Diese Region ist in allen klonierten MaxiK hoch konserviert und enthält ein Sequenzmotiv mit vielen negativ geladenen Resten (Aspartat). Allerdings ist die Ca^{2+} -Bowl nur für 56% der Ca^{2+} -Bindung verantwortlich (Bian et al., 2001). Dies deutet auf die Existenz von mehr als einer Ca^{2+} -Bindungsstelle hin.

Shi & Cui (2001) und Zhang et al. (2001) haben die Ca^{2+} -Sensoren in zwei Klassen eingeteilt: einen High-Affinity- Ca^{2+} -Sensor (Ca^{2+} -Bowl) und einen Low-Affinity- Ca^{2+} - / Mg^{2+} -Sensor, der entweder von intrazellulärem millimolarem Ca^{2+} oder Mg^{2+} aktiviert werden kann. Inzwischen sind mindestens drei voneinander relativ unabhängige Ca^{2+} -Regulations-Mechanismen durch Mutationen identifiziert, die zusammen die gesamte Ca^{2+} -Sensitivität der Kanäle ausmachen (Magleby, 2003).

Alle wichtigen Ca^{2+} -Bindungsstellen befinden sich im C-Terminus im Bereich von RCK1 und RCK2. Diese RCK-Domänen scheinen Schlüsselemente im Ca^{2+} -abhängigen Schalten von intakten Kanälen zu sein (Jiang et al., 2002; Magleby, 2003). Ein zweiter High-Affinity- Ca^{2+} -Sensor neben der Ca^{2+} -Bowl befindet sich im Bereich von RCK1 (entweder D362 / D367 (Xia et al., 2002) oder M513 (Bao et al., 2002), die evtl. über den gleichen Regulationsmechanismus wirken (Magleby, 2003)). Ein Low-Affinity- Ca^{2+} - / Mg^{2+} -Sensor, der als wichtige Bindungsstelle für Mg^{2+} gilt, befindet sich ebenfalls im Bereich von RCK1 (E374 / E399 / Q397; Shi et al., 2002; Xia et al., 2002).

Alle bisher bekannten Bindungsstellen beeinflussen die MaxiK-Aktivierung unabhängig voneinander (Hu et al., 2006). Die Beiträge dieser einzelnen Stellen zur Kanalaktivierung sind komplex und hängen u. a. von der Kombination aus intrazellulärem Ca^{2+} und Mg^{2+} ab.

Modulation durch die β -Untereinheit

Abhängig vom Zelltyp können verschiedene MaxiK-Ströme beobachtet werden, die sich hauptsächlich in Ca^{2+} -Sensitivität, Kinetik und Pharmakologie unterscheiden. Da bei Säugern aber nur ein Gen den MaxiK kodiert, genannt Slo (Orio et al., 2002), kann man die dramatischen Veränderungen der Eigenschaften v. a. der Interaktion der MaxiK mit speziellen regulierenden β -Untereinheiten zuschreiben (Orio et al., 2002).

Im Gegensatz zu den K_v , deren β -Untereinheiten intrazelluläre Proteine sind, die die Inaktivierung modulieren (Jan & Jan, 1997), bestehen die β -Untereinheiten des MaxiK aus zwei Transmembran-Segmenten, die durch einen großen extrazellulären Loop mit zytosolischem N- und C-Terminus verbunden sind (McManus et al., 1995). S0 und ein Teil des extrazellulären N-Terminus der α -Untereinheit des MaxiK bestimmen die Bindungsstelle für die β -Untereinheit (Wallner et al., 1996). Im Moment sind vier β -Untereinheiten (β 1- β 4)

von Säugern geklont und charakterisiert ($\beta 1$: Knaus et al., 1994; $\beta 2$: Wallner et al., 1999; $\beta 3$: Brenner et al., 2000a; $\beta 4$: Meera et al., 2000). Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihres Einflusses auf Sensitivität, Schaltverhalten und Pharmakologie deutlich (Behrens et al., 2000; Ransom et al., 2002). Die in dieser Arbeit verwendete $\beta 1$ -Untereinheit ist wesentlich für die MaxiK-Eigenschaften in glatten Gefäßmuskelzellen verantwortlich, wo sie besonders hoch exprimiert ist.

Die primäre Aufgabe der β -Untereinheiten besteht darin, den Offenzustand des Kanals zu stabilisieren. Sie modulieren die Ca^{2+} -Sensitivität des MaxiK, wenn der Kanal in seinem Ca^{2+} -modulierten Zustand bei Konzentrationen von mehr als $1\mu\text{M Ca}^{2+}_i$ ist (Meera et al., 1996; Ramanathan et al., 2000; Nimigean & Magleby, 2000). Außerdem verändern die β -Untereinheiten die Kinetik (Meera et al., 1996; Wallner et al., 1999; Nimigean & Magleby, 2000; Moss et al., 1999), die Spannungsabhängigkeit (Wallner et al., 1995), die pharmakologischen Eigenschaften wie die Toxinbindung (McManus et al., 1995; Hanner et al., 1997) und machen den Kanal z.B. empfänglich für die Aktivierung durch nanomolares DHS-1(dehydrosoyasaponin-1). Auch die β -Untereinheit ist Angriffsort von Modifikationen wie Oxidation / Reduktion (Zeng et al., 2003b) oder Phosphorylierung und Glykosylierung (Jin et al., 2002), was besonders im extrazellulären Loop der β -Untereinheit stattfindet.

Andere Regulationsmechanismen

Inzwischen wurde nachgewiesen, dass die Aktivität des MaxiK neben den oben erwähnten Regulationsparametern (Membranpotential, intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, regulierende β -Untereinheit) auch durch viele weitere Faktoren moduliert werden kann. Eine wachsende Liste von interagierenden Proteinen zeigt, dass die intrazellulären Domänen der α -Untereinheit - insbesondere der lange C-Terminus - als Anker für verschiedenste Proteine dienen, die dort binden und ihre Funktion ausüben (Lu et al., 2006).

MaxiK-Kanäle befinden sich regelmäßig in der Nähe von Ca^{2+} -Kanälen der Plasmamembran wie dem α_1 3.2 T-Typ- Ca^{2+} -Kanal im ZNS (Chen et al., 2003), dem L-Typ- Ca^{2+} -Kanal von Blase und Hirn (Liu et al., 2004; Grunnet & Kaufmann, 2004) oder den Ca^{2+} -Kanälen von internen Membranen (Ryanodin- oder IP_3 -Rezeptor). In der glatten Muskulatur assoziieren die MaxiK in makromolekularen Komplexen u. a. mit dem $\beta 2$ -adrenergen Rezeptor ($\beta 2\text{AR}$) über den 3. intrazellulären Loop des $\beta 2\text{AR}$ (Chanrachakul et al., 2004; Liu et al., 2004). Dilatoren der glatten Muskulatur wie $\beta 2$ -adrenerge Agonisten, NO, PGI_2 (Prostacyclin), Arachidonsäure und CO aktivieren die MaxiK (Lu et al., 2006; Schubert & Nelson, 2001),

während potente Vasokonstriktoren wie AT- (Angiotensin) II und Thromboxan A₂ die MaxiK-Aktivität über Src- („Sarcoma“-)Tyrosinkinase-abhängige Phosphorylierung hemmen (Alioua et al., 2002).

Studien an nativen Zellen haben gezeigt, dass MaxiK-Kanäle durch verschiedene Proteinkinasen moduliert werden können. Die Mehrzahl der möglichen Phosphorylierungsstellen für PKA, PKG, PKC und Tyrosinkinase in der α -Untereinheit befindet sich in der Tail-Region des C-Terminus (Wang et al., 1999; Zhou et al., 2002; Tian et al., 2003; Liu et al., 2004).

1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit

In Anbetracht der Schlüsselrolle, die die PLC in der Kontrolle der PIP₂-Konzentration in der Plasmamembran und in der Bildung von IP₃ und DAG einnimmt, ist es wichtig, über pharmakologische Hilfsmittel zu verfügen, die eindeutige Manipulationen der PLC-Aktivität und dadurch des PIP₂-Metabolismus erlauben.

In den 1990er Jahren wurde gezeigt, dass U73122 die Phospholipase C hemmt (Bleasdale et al., 1989; Smith et al., 1990). U73122 ist heute einer der am meisten gebrauchten PLC-Inhibitoren. Häufig wird das strukturell verwandte U73343 als Negativ-Kontrolle genutzt, weil ihm die PLC-inhibitorische Wirkung fehlt (Smith et al., 1990). U73122 wird oft als Schnelltest auf die Beteiligung der PLC an Signalwegen benutzt und um die verschiedenen Facetten der PIP₂-assoziierten Signalwege zu untersuchen.

Allerdings ist die Selektivität von U73122 nicht unumstritten (siehe auch Kapitel 4; Vickers, 1993; Jin et al., 1994; Mogami et al., 1997; Horowitz et al., 2005). Voruntersuchungen in unserer Arbeitsgruppe an GIRK-Kanälen dissoziierter Neurone ergaben ebenfalls Hinweise, dass U73122 Kir3-Kanäle direkt - auf PLC-unabhängige Weise - hemmen kann (Sickmann et al., 2008).

Basierend auf diesen Befunden habe ich in dieser Arbeit zunächst die Modalitäten der blockierenden Wirkung von U73122 auf Kir-Kanäle in nativen und heterolog exprimierenden Präparaten analysiert. Als nächsten Schritt habe ich weitere K⁺-Kanäle dahingehend untersucht, ob sie sich ebenfalls durch U73122 in einer PLC-unabhängigen Weise blockieren lassen und inwieweit sich die Mechanismen des Blocks strukturell und funktionell vergleichen lassen.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologie

Die verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Kits sind im Anhang aufgelistet. Die Handhabung entsprach - soweit nicht anders angegeben - den Protokollen der Hersteller. Die einzelnen Arbeitsschritte in der Molekularbiologie können bei Sambrook et al. (1998) nachgeschlagen werden.

2.1.1 Die Zellkultur

HEK293-Zellen (ATCC-Nummer [www.atcc.org]: CRL-1573)

Die Durchführung der Patch-Clamp-Experimente erfolgte an HEK-Zellen (=human embryonic kidney cells) der Linie 293. Hierbei handelt es sich um eine permanente Zelllinie, die aus der Transformation von menschlichen embryonalen Nierenzellen mit Adenovirus Typ5-DNA entstanden ist (Graham et al., 1977). Das Wachstum erfolgt epithelial adhärent. Diese Zellen wurden mir freundlicherweise von Dr. A. Schromm, Forschungszentrum Borstel, zur Verfügung gestellt.

Die HEK-Zellen zeigen eine hohe Teilungsrate und sind relativ tolerant gegenüber der Zusammensetzung des Nährmediums, pH-Änderungen, niedrigen Temperaturen und der Behandlung mit Trypsin zum Ablösen der Zellen.

Das Nährmedium

Für die Kultur der HEK-Zellen wurde das Fertigmedium MEM (Modified Eagle Medium) bzw. zum schnelleren Wachstum und zur Erholung nach Transfektion das mit Glukose versetzte Medium D-MEM (Dulbecco's MEM) verwendet. Dem Medium wurden jeweils 10% FCS (Fetal Calf Serum) und 1% einer Penicillin / Streptomycin-Lösung zugefügt, um die Gefahr einer Bakterien-Kontamination zu verringern. Bei stabil transfizierten Zelllinien wurde ein weiteres Antibiotikum zugesetzt, damit die Zellen das Gen für den entsprechenden stabil transfizierten Kanal behalten (eukaryotische Resistenz): für die ROMK-Zelllinien Hygromycin B (0,05 mg/ml) und Zeocin (0,1 mg/ml), für die MaxiK-Zelllinien Geneticin G418 (0,5 mg/ml).

Kultur der Zellen

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Kultur der Zellen erfolgte in gasdurchlässigen Zellkulturflaschen (25 cm²) mit jeweils 8 - 10 ml Medium. Alle 2 - 3 Tage wurde das Medium gewechselt. Bei totaler optischer Konfluenz, d.h. 1 - 2 x pro Woche mussten die Zellen gesplittet werden. Zum Passagieren (Ausdünnen / Umsetzen) wurden die Zellen zuerst zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen, um das restliche Medium abzuspülen, und dann mit 1 ml Trypsin-EDTA versetzt. Nach 5 - 10 min im Brutschrank wurden die Zellen vom Boden abgeklopft und 1:10 - 1:50 gesplittet.

Zum Anlegen von Sicherheitskulturen wurden 1,5 - 2,5 Millionen Zellen in 0,75 ml Medium in ein Kryotube gegeben und 0,75 ml Medium mit 20%igem DMSO (Di-methyl-sulf-oxid) hinzugefügt. Anschließend wurden die Tubes zügig in einen -80°C-Gefrierschrank überführt.

Nach dem Auftauen wurde der Kryotube für 5 min mit 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen anschließend mit 8 ml Medium in eine Kulturflasche überführt. Nach 7 - 14 Tagen konnten die Zellen zum ersten Mal für Messungen verwendet werden.

2.1.2 Verwendete Kanäle und Vektoren

In dieser Arbeit wurden verschiedene K⁺-Kanäle untersucht. Die entsprechenden Vektoren mit den verschiedenen Insets wurden mir freundlicherweise von den in Tabelle 2.1 genannten Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Außerdem zeigt Tabelle 2.1 die entsprechenden Bakterienstämme, durch die die Vektoren vermehrt werden können, und die Antibiotika, die zur Selektion benutzt wurden.

2.1.3 Klonierung der Bakterien und Plasmidgewinnung

Die folgenden Arbeitsschritte wurden sowohl für die Vermehrung der von anderen Arbeitsgruppen erhaltenen Vektoren mit den Kanal-Insets als auch für die Vermehrung der weiter unten beschriebenen selbst durchgeführten Mutationen verwendet.

Tabelle 2.1. Verwendete Kanäle, dazugehörige Vektoren, Bakterien zur Vermehrung und Antibiotika zur Selektion

Kanal	Vektor	Transfektion	Bakterien	Antibiotikum	Erhalten von
Kir1.1	pcDNA5 / pFRT-lacZneo	stabil in HEK			Dr. K. Steinmeyer, Sanofi-Aventis, Frankfurt
Kir2.1	pcDNA3	transient	E.coli (TOP10)	Ampicillin (100 µg/ml)	Prof. A. Karschin, Physiologisches Institut, Universität Würzburg
Kir3.1/3.2 (bi-cistronisch)	pcDNA3	transient	E.coli (TOP10)	Ampicillin (100 µg/ml)	Prof. A. Karschin, Physiologisches Institut, Universität Würzburg
5-HT _{1A} -Rezeptor	pcDNA3	transient	E.coli (TOP10)	Ampicillin (100 µg/ml)	Prof. A. Karschin, Physiologisches Institut, Universität Würzburg
MaxiK α + β 1	pcDNA3	stabil in HEK			Dr. A. Schromm, Forschungszentrum Borstel
MaxiK α (hSLO1-GFP)	pcDNA3	transient	E.coli (TOP10)	Ampicillin (100 µg/ml)	Dr. A. Schromm, Forschungszentrum Borstel
IK1	pcDNA3	transient	E.coli (TOP10)	Ampicillin (100 µg/ml)	Prof. S. Werner, Institut für Zellbiologie, ETH Zürich
KCNQ1 / E1	pFrog	transient	E.coli (TOP10)	Ampicillin (100 µg/ml)	Dr. M. Schwake, Biochemisches Institut, Universität Kiel
KCNQ2 / KCNQ3	pFrog	transient	E.coli (TOP10)	Ampicillin (100 µg/ml)	Dr. M. Schwake, Biochemisches Institut, Universität Kiel
EGFP	pEGFP-C1	transient	E.coli (TOP10)	Kanamycin (25 µg/ml)	Clontech, Mountain View, CA, USA
Eigene Konstrukte	pcDNA-DEST47	transient	E.coli (TOP10)	Ampicillin (100 µg/ml)	

Die Klonierung der Bakterien

Nach der Transformation der chemokompetenten E.coli (Invitrogen, Karlsruhe) mit dem Vektor wurden die Bakterien auf Platten mit LB-Agar ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag konnten einzelne Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in sterilisierte 5 ml Fläschchen mit LB-Flüssigmedium überführt werden. Die Fläschchen wurden bei 37°C und 220 rpm im Schüttler inkubiert, bis nach 12 - 24 h eine deutlich Trübung des Mediums auftrat. Jeweils 4 ml Flüssigkultur wurden mit einer Miniprep (Qiagen, Hilden) isoliert und auf das Vorhandensein des Vektors überprüft (siehe Abschnitt 2.1.4). Der Klon mit der größten Plasmid-Ausbeute wurde für die weitere Benutzung konserviert bzw. in größerem Maßstab vermehrt.

Um die Bakterien kurzfristig zu konservieren, konnten die Bakterien-Platten und die 5 ml Flüssig-LB-Fläschchen mehrere Wochen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden. Zur dauerhafte Konservierung wurden die Klone in Glycerol-Stammlösungen (300 µl 60%iges Glycerol + 700 µl Bakterienkultur) bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die E.coli ausplattiert und einzelne Kolonien zum Animpfen gepickt.

Die Plasmidgewinnung

Für die Plasmidgewinnung waren zwei Wege möglich. Benötigte man nicht viel DNA für die elektrophysiologischen Messungen, reichte im Allgemeinen eine Miniprep (Qiagen, Hilden) aus. Ansonsten musste eine Maxiprep (Sigma, Taufkirchen oder Qiagen, Hilden) durchgeführt werden. Sowohl bei der Miniprep als auch bei der Maxiprep erfolgte die Vektorisolierung aus den E. coli nach Anleitungen der Hersteller mit einigen Abweichungen. Um bei Bedarf die DNA-Ausbeute bei der Maxiprep zu maximieren, wurde die Menge der Flüssigkultur von 125 auf 1000 ml erhöht, die mit 1 ml aus einer 5 ml Kultur angeimpft wurde. Um das entsprechend größere Bakterien-Pellet zu verarbeiten, wurden die benötigten Substanz-Volumina der Maxiprep verdoppelt. Außerdem wurde zur Vorfiltration ein steriler Miracloth-Filter verwendet und der Tris-Puffer auf 65°C erhitzt, wodurch sich die Plasmidausbeute deutlich erhöhte.

Nach Präparation wurde die DNA-Ausbeute durch Absorptionsmessung im Spectrophotometer NanoDrop (ND-1000; PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) ermittelt. Dabei wurde zum einen die Reinheit der DNA überprüft (Verhältnis der Absorptionwerte von 260 / 280 nm) und zum anderen die DNA-Ausbeute bestimmt und bei >0,2 µg / µl für die Transfektion verwendet. Anschließend wurde die DNA bei -80°C gelagert.

2.1.4 Verwendete Nachweismethoden

Nachweismethoden für die entsprechenden Insets wurden benötigt, um bei der Klonierung der Bakterien die positiven Klone zu selektionieren. plante man eine Maxiprep oder eine sonstige Weiterverarbeitung, dann musste der Nachweis (Enzymverdau oder PCR-Methode) vor dieser Weiterverarbeitung erfolgen.

Restriktionsverdau und Gel-Elektrophorese

Die passenden Restriktionsenzyme für den entsprechende Vektor und das Inset wurden bei Rebase[®] (<http://rebase.neb.com>) ausgesucht. In diesem Programm wurden auch die theoretischen Fragmentlängen errechnet, mit denen man später die tatsächlichen verglich. Folgende Enzyme wurden verwendet (alle von Promega, Madison, WI, USA):

Apa, Cla I, Ecor I, Hae II, Hind III, Nco I, Sac I, Sma I

Tabelle 2.2 Versuchsprotokoll für den Restriktionsverdau

Plasmid-DNA	1 µg (von der Miniprep)
Multicorepuffer (1:10)	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl (10 units)
H ₂ O	ad 20 µl
Verdau 60 min bei 37°C	
Anschließend Zugabe von loading dye	4 µl

Die Analyse des Verdau erfolgte auf einem 1,2%igen Agarosegel zusammen mit einer 1 kb-Basenladder.

PCR-Nachweis

Der Nachweis über eine Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR, s. u.) ist etwas aufwendiger und wurde v. a. nach Mutationen eingesetzt. Der Ansatz und das Protokoll wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Primer wurden so ausgewählt, dass sie jeweils am Anfang und am Ende des Insets binden. Ein drittes Primerpaar konnte u. U. für die Mitte des Insets konstruiert werden. Anschließend wurde das PCR-Produkt wiederum auf einem Agarosegel aufgetragen.

Sequenzierung

Mit den oben genannten Nachweismethoden ist es nicht möglich, kleinere Mutationen oder sogar Punktmutationen nachzuweisen. Bei einer einfachen Vermehrung eines Vektors in E.coli sind diese Nachweise ausreichend, da die Wahrscheinlichkeit von neu aufgetretenen Mutationen im Inset gering ist. Sobald allerdings eine PCR durchgeführt wurde - z.B. um Kanäle zu mutieren - musste das neue Konstrukt zum Sequenzieren eingeschickt werden (Eurofins MWG Operon, Ebersberg), da nur auf diese Weise fehlerhafte Basenpaare erkannt werden können.

2.1.5 Eingesetzte Mutationsmethoden

Für alle Mutationen wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt, um bestimmte DNA-Sequenzen zu verändern oder zu vervielfältigen.

Die Sequenzen der verschiedenen benötigten Forward- und Reverse-Primer (Tabelle 2.3) wurden am PC anhand der bekannten Kanal-Sequenzen konstruiert, mit Hilfe des Programms „Fast PCR“ (University of Helsinki, Finnland) kontrolliert und von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2.3 Eingesetzte Primer-Sequenzen für die verschiedenen Kanäle

Kanal	Forward-Primer-Sequenz	Reverse-Primer-Sequenz
MaxiK _{I322}	caccatggatgCGctcatcatc	gatttcagggacgtagctggcaaacaat
MaxiK _{I322} +ER-Export-Sequenz	caccatggatgCGctcatcatc	caggcagaagatcaggtc gatttcagggacgtagctggcaaacaat
MaxiK _{L360} +ER-Export-Sequenz	caccatggatgCGctcatcatc	caggcagaagatcaggtc caggaa gttggaaacactctccag
MaxiK _{A435} +ER-Export-Sequenz	caccatggatgCGctcatcatc	caggcagaagatcaggtc cgcatccgggtcagcgcgagta
MaxiK _{E576} =core	caccatggatgCGctcatcatc	ctactctcgggtggcagacttga
MaxiK _{S577-L1113} =tail	caccatgagccgtatattaattaatcct	aagccgctcttctgcacgta
Kir2.1(L222I)	aaccttcgcaagagccac-att- gtggaagctcatgtccgg	ccggacatgagctccac-aat- gtggctcttgcgaagggt
Kir3.2(I232L)	gaccttaggaattccac-ctg- gtggaggcttccatcaga	tctgatggaagcctccac-cag- gtgggaattcctaaggctc
Kir3.1 _{Kir2.1-PIP} F1+R1	caccatgtctgcactccgaagg	ccacatcaagcagagtttccgtccctcatgga aat
Kir3.1 _{Kir2.1-PIP} F2+R2	ggggagtacatccccttgaccaactgaact ggat	ctatgtgaagcgggtcagagttcattttc
Kir3.2 _{Kir2.1-PIP} F1+R1	caccatggccaagctgacagaa	ccacatcaagcagagttcccatcccgatgg agat
Kir3.2 _{Kir2.1-PIP} F2+R2	ggggagtacatcccctgaaccagacggata tcaac	ctaaactttggattcattctcc
Kir3.1 _{G431}	caccatgtctgcactccgaagg	ctaaccctaatataggcttttctgaagt
Kir3.1 _{C179_V179} Kir2.1 F1+R1	caccatgtctgcactccgaagg	cttcgccatcttcgcatgacgcagccgatga ggaaagcgtc
Kir3.1 _{C179_V179} Kir2.1 F2+R2	gacgcttctcatcggtcgcgtcatggcgaag atggcgaag	ctatatctccgattctcgccttaaagg
Kir3.2 _{C188_V179} Kir2.1 F1+R1	caccatggccaagctgacagaatcc	cttcgccatcttcgcatgacgcacccacat gaatgcatt
Kir3.2 _{C188_V179} Kir2.1 F2+R2	aatgattcatggtgggatcgcgtcatggcgaa gatggcgaag	ctatatctccgattctcgccttaaagg
Kir2.1 _{Y326_F328} Kir3.1 F1+R1	caccatgggcagtgtagaaccaac	ttctaaagaaattacaggaagtagcggtagc cccagagaat
Kir2.1 _{Y326_F328} Kir3.1 F2+R2	attctctggggtcaccgctacttccctgtaatttct ttagaa	ctatgtgaagcgggtcagagttcattttct
Kir2.1 _{Y326_T337} Kir3.2 F1+R1	caccatgggcagtgtagaaccaac	ctccagggtcaggacaggtgtgtagcggtaga cccagagaat
Kir2.1 _{Y326_T337} Kir3.2 F2+R2	attctctggggtcaccgctacacacctgtcctg accctggag	ctaaactttggattcattctccaggtttgc

Punktmutationen

Für die Punktmutationen (site-directed mutagenesis; Kir2.1(L222I) und Kir3.1(I232L)) wurde das QuikChange[®] II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) benutzt. Die gewünschte Mutation wurde in den Primer integriert und so während der Amplifikation in die DNA eingebaut. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Im Gegensatz zu den Herstellerangaben wurde die DNA anschließend in TOP10-E.coli vermehrt.

TOPO-Cloning und das Gateway-System

Für alle Mutationen, bei denen mehr als eine Aminosäure verändert werden sollte, wurde zum Klonieren der PCR-Fragmente das sog. TOPO-Cloning (pENTR Directional TOPO[®] Cloning Kit) von Invitrogen (Karlsruhe) eingesetzt. Dies ist eine einfache und schnelle Methode, um PCR-Fragmente in einen Vektor einzubauen.

Der Schlüssel dabei ist das Enzym DNA-Topoisomerase 1, das an beiden Enden des gespaltenen pENTR-D-TOPO-Vektors kovalent gebunden ist und das sowohl als Restriktionsenzym als auch als Ligase funktioniert. Diese beiden Topoisomerase-Enzyme verknüpfen das Insert mit dem Vektor, während sich das Enzym von der DNA ablöst. Der TOPO-Vektor enthält an seinem 5'-Ende einen Einzelstrang-GTGG-Überhang und ein blunt-end am 3'-Ende. Damit das Insert richtig herum eingebaut werden kann, ist es wichtig, dass das 5'-Ende des PCR-Fragmentes die komplementäre CACC-Sequenz enthält.

Ein weiterer Vorteil des TOPO-Clonings ist die einfache Integration eines Entry-Vektors (pentr-D-TOPO-Vektor) in den Destination-Vektor (Gateway[®]-Vektor, pcDNA-DEST47 für die Expression in Säuger-Zellen). Dabei bleiben Orientierung und Leseraster erhalten, so dass nach dem Subklonieren in den Entry-Vektor keine zweite Sequenzierung nötig ist.

Alle Schritte des TOPO-Clonings erfolgten nach Herstellerangaben. Abweichen konnten lediglich die Annealing-Temperaturen - je nach Schmelzpunkt der Primer. Vermehrt wurde die DNA in TOP10-E.coli.

Deletions-Konstrukte

Alle Deletions-Konstrukte (BK_{I322}, BK_{L360}, BK_{E576}, Kir3.1_{G431}) wurden mit entsprechenden Primern (Tabelle 2.3) durch PCR (LongRange PCR Kit, Qiagen, Hilden) erzeugt. Die

entstandenen PCR-Produkte wurden dann in den pENTR-D-TOPO-Vektor und anschließend in den pcDNA DEST47-Vektor kloniert.

Fusions-PCR für die Kir3.1/3.2-Kir2.1-Chimären

Alle Kir3.1/3.2-Kir2.1-Chimären (Kir3.1/3.2_{Kir2.1-PIP}, Kir3.1/3.2-Kir2.1, Kir2.1-Kir3.1/3.2) wurden mit einer Zwei-Schritt-Fusions-PCR-Technik mit Hilfe des LongRange PCR Kit (Qiagen, Hilden) konstruiert.

Um die Kir3.1/3.2_{Kir2.1-PIP}-Chimären zu erhalten, wurde die PIP₂-Domäne des Kir2.1 (K207-L245) in den Kir3.1 (G207-L246) bzw. Kir3.2 (G216-L255) transferiert. Dabei wurden zunächst die beiden Teile des Kir3.1/3.2 vor und nach der PIP₂-Bindungsstelle in zwei separaten PCR-Reaktionen amplifiziert. Die Sequenzen der verwendeten mittleren Primer reichten dabei in die spätere PIP₂-Bindungsstelle des Kir2.1 hinein. Im zweiten Schritt wurde der Kir2.1 als Template zusammen mit den Reaktionsprodukten aus Schritt1 (als Primer) benutzt und so die endgültige Chimäre amplifiziert.

Für die Kir3.1/3.2-Kir2.1- und die Kir2.1-Kir3.1/3.2-Chimären wurden die beiden Teile der späteren Chimäre zunächst einzeln amplifiziert. Dabei reichten die beiden mittleren Primer als Fusionsprimer jeweils in den zweiten Teil der Chimäre hinein. Nach Aufreinigung (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden) wurden die beiden Teile durch eine weitere PCR mit dem Start- und dem End-Primer fusioniert.

Die entstandenen Chimären wurden in den pENTR-D-TOPO-Vektor und nach Sequenzierung in den pcDNA DEST47-Vektor einkloniert.

Die Basen-Sequenzen der verschiedenen Konstrukte sind im Anhang aufgelistet.

2.1.6 Die Transfektion

Aufgrund der hohen Effizienz und des relativ einfachen Versuchsprotokolls wurde die liposomale Transfektion verwendet. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Experimente mit vielen verschiedene Kanalvektoren durchgeführt. Aus diesem Grund wurde auf die aufwendige Methode der stabilen Transfektion verzichtet und stattdessen die wesentlich flexiblere transiente Transfektion verwendet. Sie wurde als Co-Transfektion durchgeführt. Dabei werden alle zum Zellsystem kompatiblen Vektoren von den Zellen, die sich in der Mitose befinden, aufgenommen und zu >90% co-exprimiert.

Die Transfektion wurde mit Superfect® von Qiagen (Hilden) durchgeführt. Was Zelldichte, Toxizität und Effizienz betrifft, wurde die Anleitung des Herstellers optimiert und kontinuierlich angepasst. Das entsprechende Protokoll ist in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.4. Transfektionsprotokoll für die transiente Transfektion mit Superfect® (nach Huth, 2005)

Arbeitsschritte	
1. Aussaat	300.000 - 500.000 Zellen pro Petrischale (3,5 cm) mit 2 ml Medium aussetzen und für 24 h absetzen lassen
2. Zelldichte	vor der Transfektion optische Dichte und Vitalität der Zellen kontrollieren
3.1 Transfektionsreagenz	- 0,5 µg EGFP-C1 + 0,5 - 2 µg cDNA der verschiedenen Konstrukte - in 100 µl Medium (ohne FCS / PS) aufnehmen - 10 µl Superfect® (Qiagen) hinzugeben
3.2 Mischen	durch vorsichtiges Pipettieren
3.3 Inkubieren	Lösung 10 min bei 20°C inkubieren
4.1 Zellen	Lösungswechsel mit 1 ml frischem Serum (mit FCS / PS)
4.2 Zugabe der Reagenz	Transfektionsreagenz hinzugeben und vermischen
5. Inkubieren	für 90 - 120 min bei 37°C und 5% CO ₂ im Brutschrank inkubieren
6. Lösungswechsel	Lösungswechsel mit 2 ml frischem Serum (mit FCS / PS)
7. Messung	nach 48 - 72 h

Zählen der Zellen

Das Zählen der Zellen ist wichtig für die Aussaat zur Transfektion. Nach dem Waschen und Ablösen der Zellen mit Trypsin wurden sie bei 3000 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert. Das FCS im Medium inaktiviert das vorhandene Resttrypsin. Je nach Zellmenge wurden 10 - 50 µl der Zellsuspension mit Trypanblau auf 200 µl gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt.

Das Markerprotein EGFP

EGFP bedeutet „Enhanced Green Fluorescent Protein“ (Prasher et al., 1992; Cormack et al., 1996) und wird für die Erkennung von transfizierten HEK-Zellen verwendet. Dafür wird der EGFP-Vektor zusammen mit dem zu untersuchenden Kanalprotein co-transfiziert. Das

Anregungsmaximum des EGFP liegt bei 488 nm im blauen Bereich und das Emissionsmaximum bei 507 nm im grünen Bereich. Mit einem entsprechend für diese Wellenlänge konzipierten Filter (siehe Abschnitt 2.3.2) können die transfizierten, grün leuchtenden Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop erkannt und elektrophysiologisch gemessen werden.

2.2 Dissoziierte Zellen

Zur Isolierung von Pyramidenzellen wurde ein etabliertes Verfahren aus kombinierter enzymatischer und mechanischer Dissoziation verwendet (Sickmann & Alzheimer, 2002).

Dafür wurden 10 - 18 Tage alte Wistar-Ratten zunächst mit einem Gemisch aus 56 mg Ketamin und 8,4 mg Xylazin anästhesiert. Nach Dekapitation wurde das Gehirn herauspräpariert und in eisgekühlter ACSF- (Artificial Cerebro-Spinal Fluid) Lösung (siehe Tabelle 2.8) unter Begasung von 95% O₂ und 5% CO₂ abgekühlt. Mit einem Vibratom (VT 1000S, Leica, Wetzlar) wurden 5 - 6 etwa 350 µm dicke Koronarschnitte vom sensorischen Cortex angefertigt. Diese Schnitte wurden dann für 30 min in mit Carbogen begaster ACSF-Lösung bei 30°C und anschließend für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Aus jedem Schnitt wurden jeweils 3 - 4 ca. 1 - 2 mm² große Fragmente aus dem Cortex präpariert und für 90 min bei 29°C in HEPES-gepufferter Papain-Lösung (21 U/ml) - die mit O₂ begast wurde - inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Fragmente wurden sie bei Raumtemperatur unter O₂-Begasung in HEPES-gepufferter Standard-Badlösung aufbewahrt. Vor jeder Messung wurde ein einzelnes Stück in eine Petrischale überführt und mechanisch dissoziiert. Dies geschah in einer Triturations-Lösung (siehe Tabelle 2.8) mit Hilfe von hitzepolierten Pasteurpipetten mit zunehmend kleiner werdendem Innendurchmesser der Spitze (ca. 1 / 0,5 / 0,2 mm).

Nach der Dissoziation wurde die Zellsuspension sofort in eine mit Badlösung gefüllte Petrischale überführt. Nachdem man den vitalen Zellen genug Zeit gegeben hat sich abzusetzen (15 - 20 min), wurde noch einmal gewaschen und die Schale dann mit Messlösung gefüllt. Der letzte Waschvorgang diente dazu, die toten Zellen aus der Lösung zu entfernen. Gemessen wurden nur die Zellen, die sich anhand ihrer Morphologie eindeutig als vitale Pyramidenzellen identifizieren ließen.

2.3 Elektrophysiologie

2.3.1 Die Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik (Hamill et al., 1981) ist eine elektrophysiologische Methode, um Ströme durch die Ionenkanäle von Zellmembranen zu messen. Die Wissenschaftler Erwin Neher und Bert Sakmann erhielten für die Entdeckung und Entwicklung dieser Methode 1991 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.

Diese Methode ermöglicht es, sowohl makroskopische Ströme über die ganze Membran einer Zelle (Whole-Cell) als auch mikroskopische Ströme durch einzelne Ionenkanäle (Single-Channel) zu messen. Dadurch kann man die Aktivität von Ionenkanälen und die Wirkungen verschiedener Substanzen auf ihre Funktion untersuchen. Auf diese Weise erhält man Kenntnisse über Aufbau und Funktion der verschiedenen Ionenkanäle.

Beim Patchen wird eine Glaspipette mit einer fein ausgezogenen Spitze - die mit interner Lösung gefüllt ist - dicht an die Zellmembran gebracht. Durch Anlegen eines Unterdrucks an der Pipette kommt es zu einer festen Verbindung zwischen Glaspipette und Membran. Dadurch bildet sich ein extrem hoher Widerstand zwischen der Innenseite der Pipette und der Zellmembran, der über $10^9 \Omega$ betragen kann. Dies bezeichnet man als Gigaseal. Es ermöglicht ein sehr geringes elektrisches Rauschen, was die Auflösung der Ströme einzelner Ionenkanäle zulässt.

Mit einem Patch-Clamp-Verstärker kann dann bei variabler Spannung der Strom über die Membran gemessen werden (Voltage-Clamp). Der Strom fließt über die Elektrode der Patch-Pipette durch das Zytoplasma der Zelle und anschließend über die Zellmembran zur Badelektrode. Dabei wirkt die Zellmembran als Kondensator, und die Kanäle stellen den entscheidenden Widerstand dar, so dass der resultierende Strom der Aktivität der in der Membran befindlichen Ionenkanäle entspricht. Gemessen wird hierbei der Kompensationsstrom, der - je nach Methode - ein Öffnen eines Kanals (Single-Channel) bzw. aller Kanäle (Whole-Cell) anzeigt.

Die Patch-Konfigurationen

In dieser Arbeit wurden drei Patch-Konfigurationen verwendet (Abbildung 2.1):

A) Cell-Attached:

Nach der Bildung des Gigaseals befindet man sich in der Cell-Attached-Konfiguration. Der Vorteil dieser Konfiguration ist, dass die Membran intakt gelassen wird und das Milieu der

Zelle unbeeinflusst bleibt. So können die Kanäle in ihrer natürlichen Umgebung gemessen werden. Dies ist dann wichtig, wenn unbekannte Kofaktoren in der Zelle für die Funktion des Kanals nötig sind. Der Nachteil gegenüber der Inside-Out-Konfiguration liegt besonders darin, dass die Lösung in der Zelle nicht kontrolliert werden kann. Außerdem geht das Membranpotential der Zelle als Unbekannte in die Messung mit ein.

B) Inside-Out:

Zieht man in der Cell-Attached-Konfiguration die Pipette ruckartig ein Stück von der Zelle weg, löst sich ein Membranstück von der Zelle, ohne dass der Sealwiderstand abnimmt. Der Vorteil ist, dass man die Lösungen und Spannung auf beiden Seiten der Membran genau kontrollieren kann. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die Kanäle nicht mehr in ihrer natürlichen Umgebung vorliegen. Bekannte Kofaktoren der Kanäle (z.B. ATP) müssen substituiert werden.

C) Whole-Cell:

Nach Erreichen der Cell-Attached-Konfiguration legt man einen plötzlichen Unterdruck an die Pipette an. Dadurch reißt die Zellmembran unter der Pipette auf und man erhält eine direkte Verbindung zwischen der Pipette und dem Zytosol. Durch den direkten Zugang zum Zytosol kann der Strom über die ganze Zellmembran erfasst werden.

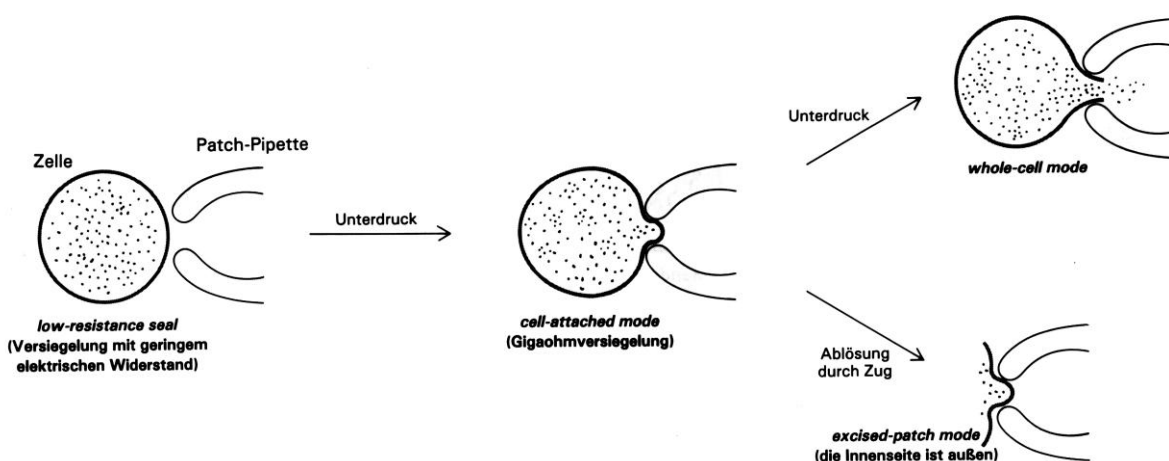


Abbildung 2.1. Die drei benutzten Patch-Konfigurationen und ihre Herstellung (Numberger & Draguhn, 1996). Der „Excised-Patch-Mode“ entspricht der Inside-Out-Konfiguration.

2.3.2 Der Patch-Clamp-Aufbau

Abschirmung

Besonders bei der Aufnahme von Einzelkanaldaten müssen sämtliche Störsignale minimiert werden. Dies stellte verschiedene Anforderungen an den Patch-Clamp-Aufbau, der sowohl vor mechanischen als auch vor elektrischen Einflüssen abgeschirmt werden musste. Um Schwingungen von außen (z.B. Schritte, Türensclagen, Gebäudeschwingungen) möglichst zu dämpfen, stand der Aufbau auf einer pneumatischen schwingungsgedämpften Arbeitsplatte. Die elektrischen Störungen, wie z.B. das 50 Hz-Netzbrummen - das die kleinen Messsignale leicht überlagern kann - wurden durch einen Faraday-Käfig abgeschirmt. Die Lichtquelle wurde mit Gleichspannung betrieben und alle Leitungen, die in den Käfig führten, waren abgeschirmt. Alle Metallteile und Geräte wurden sorgfältig geerdet.

Mikroskop

Gearbeitet wurde an einem inversen Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovert 35, Zeiss, Jena) mit Hoffman-Phasenkontrastoptik für dissoziierte Zellen. An das Mikroskop wurde zur Anregung des EGFP ein High-Power-LED-Modul (Rapp OptoElectronic GmbH, Hamburg; siehe Application note) mit blauen LEDs der Wellenlänge 475 nm zugeschaltet und im Filterblock zusätzlich ein EGFP-tauglicher Filtersatz (HQ-Filterset für EGFP, AHF Analysetechnik, Tübingen) eingesetzt. Dadurch war es möglich, transfizierte Zellen mit dem EGFP-Filter zu erkennen. Für Einzelkanalmessungen wurde die LED nach Erreichen der Patch-Konfiguration ausgeschaltet, da sie trotz guter Abschirmung einen gewissen Rauschanteil verursachte.

Aufbau der Patch-Clamp-Anlage

Neben dem Mikroskoptisch befanden sich zwei hydraulische Mikromanipulatoren (Narishige, Tokyo, Japan), die eine präzise Annäherung an die Zelle ermöglichten. Der rechte Mikromanipulator diente zur Feinsteuerung der Pipette, während mit dem linken die Feineinstellung des Perfusionsfilaments gesteuert wurde. Diese Mikromanipulatoren waren mit den beiden 3D-Manipulatoren oberhalb des Objektisches zur Grobeinstellung verbunden. Am rechten 3D-Manipulator war der Vorverstärker mit dem Pipettenhalter befestigt. Der Pipettenhalter diente dazu, die elektrische Verbindung zwischen der Pipette

und dem Vorverstärker herzustellen. Außerdem war seitlich an den Pipettenhalter ein Luftschlauch mit Dreiwegehahn und wassergefülltem U-Rohr angeschlossen, der das Anlegen eines Unter- bzw. Überdruckes an die Pipette ermöglichte. In regelmäßigen Abständen wurde der Pipettenhalter mit destilliertem Wasser gereinigt und anschließend mit Druckluft getrocknet.

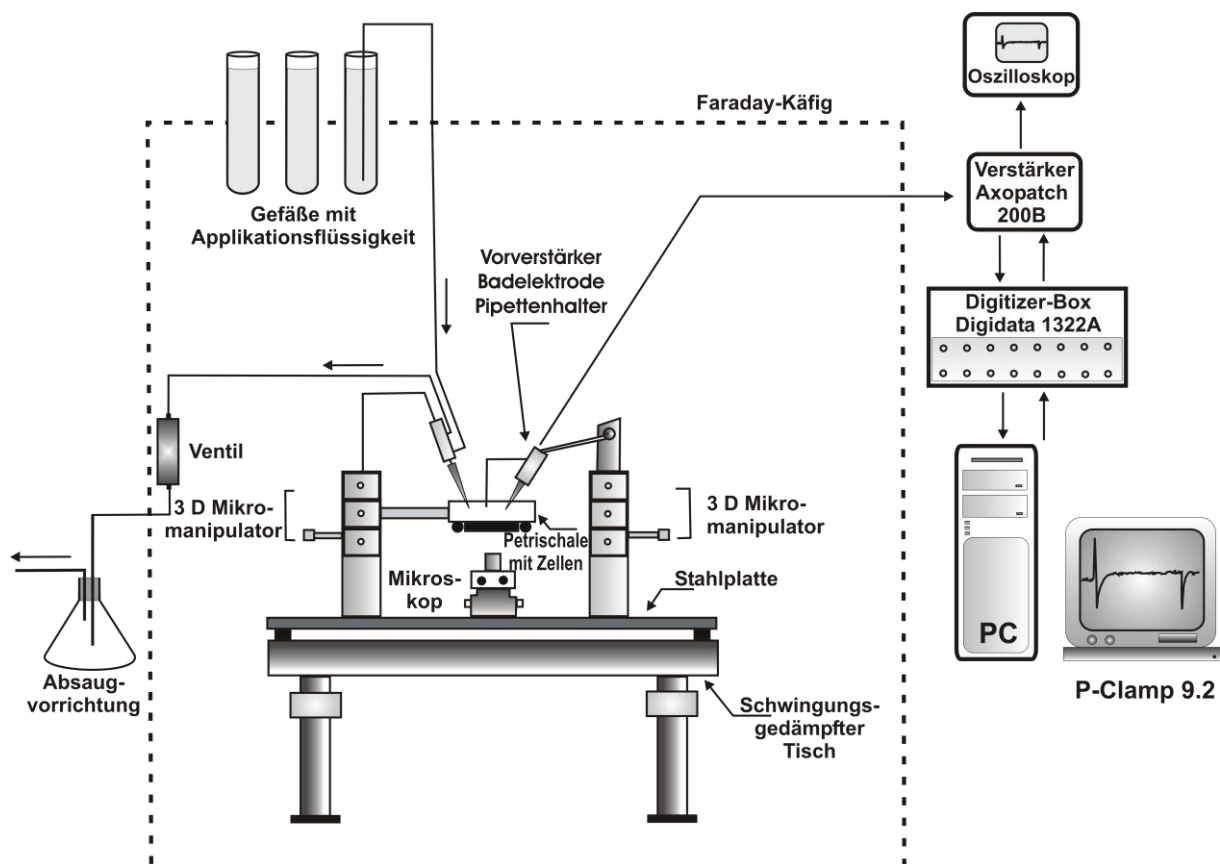


Abbildung 2.2. Schematischer Aufbau der Patch-Clamp-Anlage und angeschlossener Geräte (Erläuterungen siehe Text).

Verstärker und Datenaufnahme

Der Patch-Clamp-Verstärker (Axopatch 200B, Molecular Devices/MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA) stellt das zentrale Steuerelement für den Benutzer dar. Er misst und filtert die von der Zelle kommenden Stromsignale. Über ihn konnten der Offset abgeglichen werden und Kapazität und Serienwiderstand kompensiert werden.

Ein zwischengeschaltetes Oszilloskop (PM3215, Philips, Hamburg) ermöglichte es, die Daten online zu betrachten und alle Einstellungen zu kontrollieren. Eine angeschlossene Digitizer-Box (Digidata 1322A, Molecular Devices/MDS Analytical Technologies, Sunnyvale,

CA, USA) digitalisierte die Signale und übertrug sie an den Computer. Zusätzlich war an das Mikroskop eine Videokamera angeschlossen mit einem Monitor, der außerhalb des Faraday-Käfigs stand, um die Zellannäherung mit der Pipette visuell zu kontrollieren und die Zelle während der Messung beobachten zu können.

Einstellung von Messprotokollen, Datenaufzeichnung, Archivierung und Datenauswertung erfolgten direkt am Computer mit der pClamp9.2-Software (Molecular Devices/MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). Dadurch konnten die Daten direkt nach der Aufnahme analysiert und die Messungen evtl. optimiert werden.

Das Filament

Um einen schnellen Lösungsaustausch zu gewährleisten, wurde eine Konstruktion mit einem Schwerkraft-getriebenen sog. Y-Filament benutzt (Abbildung 2.3; Eigenbau).

Das Filament war ein ca. 45 mm langes flexibles (polyamid-beschichtetes) Glasfaserröhrchen mit einem Innendurchmesser von 0,1 mm. Es war auf der einen Seite mit einem Zulaufschlauch verbunden, dessen anderes Ende in einem Applikationsgefäß mit Messlösung oberhalb des Messplatzes steckte. Auf der anderen Seite war das Filament über einen Ablaufschlauch mit der Absauganlage verbunden. Sobald die Saugpumpe angestellt wurde, wurde die Lösung angesogen. Wichtig war, dass das Ende des Filaments in die Lösung tauchte, sobald die Saugung betätigt wurde, damit keine Luftblasen hineingelangen, die das Seal zerstören würden. Um den Zulaufschlauch zu befüllen, war etwa 1 ml Lösung nötig. Sobald die Saugung gestoppt wurde, tropfte die Lösung aus dem Filament. Zum Lösungswechsel wurde der Zulaufschlauch ins nächste Lösungsgefäß gesteckt und die Absaugung wieder aktiviert. Auf diese Weise war ein schneller Lösungsaustausch möglich, der beim Abstellen der Saugung mit einer Latenz von nur ca. 1 s an der Zelle ankam.

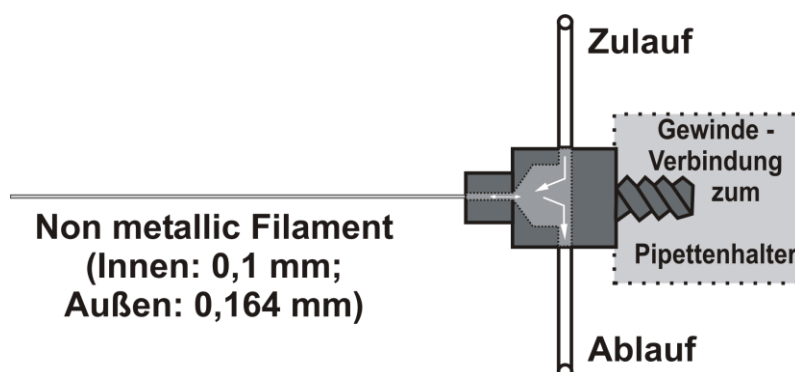


Abbildung 2.3. Schematischer Aufbau des Filaments.

Klimaanlage

Um einheitliche Messbedingungen zu gewährleisten, wurde die Raumtemperatur im Versuchsraum mit einer Klimaanlage bei 21 - 22°C gehalten.

2.3.3 Herstellung der Pipetten und Elektroden

Verwendete Patch-Pipetten

Die Patch-Pipetten wurden vor jeder Versuchsserie frisch aus Glaskapillaren mit Hilfe eines Pipettenziehgerätes (DMZ-Universal-Puller, Zeitz-Instruments, München) hergestellt. Zum Einsatz kamen drei verschiedene Rohlinge (alle von Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) - je nach Zelle und Patch-Konfiguration (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5. Eigenschaften der benutzten Glaskapillaren

Messmethode	Dissoziierte Neurone	HEK Whole-Cell	HEK Inside-Out
Material	Borosilikatglas	Borosilikatglas	Borosilikatglas
Innendurchmesser / mm	1,17	0,86	0,86
Außendurchmesser / mm	1,5	1,5	1,5
Pipettenwiderstände / MΩ	5 - 7	2 - 5	10 - 20
Poliert	nein	ja	nein
Filament	ja	ja	nein
Beschichtung mit Sigmacote®	nein	nein	ja

Bei dem Filament handelt es sich um einen Glasfaden, der innerhalb des Rohlings verläuft. Er erleichtert das blasenfreie Befüllen mit Messlösungen.

Pipetten für Einzelkanal-Messungen müssen besonders kleine Öffnungsdurchmesser besitzen, um möglichst nur einen aktiven Ionenkanal in dem Membran-Patch zu enthalten. Zur Aufnahme von Einzelkanal-Messungen wurden von innen beschichtete Pipetten verwendet. Dafür wurde Sigmacote® (chlorinated organopolysiloxane in heptane; Sigma, Deisenhofen) benutzt - eine hydrophobe Substanz, die einen dünnen Silikatfilm auf Glasoberflächen bildet und so die Oberflächenladungen abschirmt. Anschließend wurden die Rohlinge mindestens zwei Tage unter dem Abzug getrocknet. Wichtig war, dass die beschichteten Pipetten nach dem Ziehen nicht sofort verwendet werden konnten, sondern für 3 - 24 h in einem Trockenschrank bei 55°C aufbewahrt und für die Messungen einzeln

entnommen wurden. Hierdurch wird das Rauschen vermindert und der Sealwiderstand verbessert (Huth et al., 2008). Daher zeigen die Einzelkanalmessungen in dieser Arbeit ein hervorragendes Signal-Rausch-Verhältnis ($\text{SNR} \approx 10$ bei 10 kHz Filterfrequenz; Abbildung 3.16A+B).

Erd- und Pipettenelektroden

Die Erd- und Pipettenelektroden bestehen aus einem chlorierten Silberdraht. Sie verbinden den Vorverstärker mit der Pipettenlösung und der Erdelektrode in der Badlösung. Beide Elektroden müssen mit Silberchlorid beschichtet werden, um Übergangspotentiale (sog. Offset-Potentiale) zu vermeiden bzw. konstant zu halten. Unter Offset-Potentialen versteht man Potentiale, die weder von der Zelle noch vom Kommandopotential hervorgerufen werden, sondern an den Übergängen innerhalb der Messkette (Pipettenelektrode → Pipettenlösung → Zytoplasma → Zellmembran → Badlösung → Erdelektrode) entstehen. Vor Herstellung des Zellkontaktes wurde ein vorhandenes Offset-Potential am Verstärker korrigiert. Zum Chlorieren wurde der Silberdraht zunächst mit Sandpapier abgeschliffen und anschließend mit der Anode einer Batterie verbunden und für etwa eine halbe Stunde in eine 150 mM Cl⁻-Lösung getaucht (9 V, 560 mA). An die Kathode wurde ein Draht angeschlossen, der zusätzlich in die Lösung tauchte. Auf diese Weise wurden die Elektronen von der Anode abgezogen und es entstand am Silberdraht Silberchlorid.

2.3.4 Die verwendeten Messlösungen

Lösungen für HEK-Zellen

Für die Messungen werden grundsätzlich zwei verschiedene Lösungen benötigt. Die externe Lösung (= Badlösung) entspricht von ihrer Ionenzusammensetzung eher dem physiologisch extrazellulären Milieu und die interne Lösung (= Pipettenlösung) der Intrazellulärflüssigkeit. Bei der Messung an K⁺-Kanälen, die bei Hyperpolarisation aktiviert werden (Kir-Familie), gibt es allerdings eine Ausnahme. In meiner Arbeit habe ich annähernd symmetrische K⁺-Konzentrationen verwendet, um bei den Messungen eine möglichst große Differenz zum eingestellten K⁺-Potential (E_K) und damit größere Ströme zu erhalten.

Als Badlösung wurde immer die externe Lösung verwendet. Für Whole-Cell-Messungen wurde die Pipette mit der internen Lösung befüllt, während die externe Lösung über das Filament appliziert wurde. Für Einzelkanal-Messungen (Inside-Out-Konfiguration)

wurde die Pipette mit externer und das Filament mit interner Lösung befüllt. Die Lösungen wurden bei 6°C im Kühlschrank aufbewahrt und vor Gebrauch auf Zimmertemperatur erwärmt. Für die Messungen an den transfizierten HEK-Zellen wurden die Lösungen aus Tabelle 2.6 und 2.7 verwendet. Die externe Lösung wurde mit NaOH auf pH 7,4 und die interne mit KOH auf pH 7,2 eingestellt.

Tabelle 2.6. Zusammensetzung der verwendeten externen Messlösungen (Konzentrationen in mMol/l). wc steht für Whole-Cell-, sc für Single-Channel-Messungen.

	Kir1 wc	Kir2 wc	Kir3 wc	MaxiK wc	IK wc	KCNQ wc	MaxiK sc	Kir3 sc
KCl	120	120	120	5	5	5	5	120
NaCl	5	5	5	140	140	140	140	5
CaCl ₂	2	2	2	1,6	1	1	1	2
MgCl ₂	2	2	2	2	3	3	3	2
HEPES	5	5	5	5	5	5	5	5
Glucose	10	10	10	5	5	5	5	10
Mannitol	50	50	50					50
CdCl ₂				(0,4) ^{a)}				

a) Bei den Messungen am MaxiK mit verschiedenen intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen wurde Cd²⁺ hinzugefügt, um Ca²⁺-Kanäle zu blockieren.

Tabelle 2.7. Zusammensetzung der verwendeten internen Messlösungen (Konzentrationen in mMol/l).

	Kir1 wc	Kir2 wc	Kir3 wc	MaxiK wc	MaxiK wc	IK wc	KCNQ wc	MaxiK sc	Kir3 sc
KCl	120			117	140	117	117	140	
K ⁺ -D-Glu- conat		135	135						135
NaCl	15	4	2	10	15	10	10	15	2
CaCl ₂				4,3	0 / 0,3 ^{b)}	4,3	4,3	0,3	
MgCl ₂	4	3	3	5	1	5	5	1	3
HEPES	5	5	5	10	5	10	10	5	5
BAPTA					(10) ^{c)}				
EGTA		5	5	5		5	5		5
GTP _γ S									0,3
Na ₂ ATP	4	2	2	2		2	2		2
NaGTP		0,3	0,3						0,3

b + c) für 300µM Ca²⁺: 0,3 mM CaCl₂ ohne BAPTA; für 0 µM Ca²⁺: 0 mM CaCl₂ und Lösung gepuffert mit 10 mM BAPTA

Lösungen für dissoziierte Neurone

Für die Messungen an den Neuronen wurden die Lösungen aus Tabelle 2.8 verwendet. Die Bad- und die extrazelluläre Lösung wurden auf pH 7,4 und die Pipettenlösung mit KOH auf pH 7,25 eingestellt.

Um eine mögliche Aktivierung der spannungsabhängigen Na⁺-Kanäle auszuschließen, wurden sie bei allen Messungen an den Neuronen durch Gabe von 1 µM TTX mit der externen Lösung blockiert.

Tabelle 2.8 Verwendete Lösungen für die Neuronen (Konzentrationen in mMol/l).

	ACSF	Trituration	Badlösung	Externe Lösung	Pipettenlösung
KCl	3	3	3	60	
K ⁺ - D-Gluconat					135
NaCl	125	125	150	85	4
CaCl ₂	2	1	2	2	
MgCl ₂	4	10	2	2	3
HEPES		10	10	5	5
Na ⁺ -HEPES		10		5	
EGTA		10			5
Glucose	10		10	10	
Na ₂ ATP					2
NaGTP					2
GTP _γ S					0,3
NaHCO ₂	25				
Na ₂ HPO ₄	1,25				
Kynurenic acid		2			

U73122 / U73343

Die beiden Substanzen wurden in mehreren Chargen entweder von Biomol (Hamburg) oder von Sigma (Deisenhofen) bezogen, was keinen Unterschied in der Wirkung ausmachte.

Nach eigener Erfahrung musste die Präparation der beiden Substanzen sehr sorgfältig erfolgen, weil sie schlecht löslich sind und in Lösung ausfallen können. Die Substanzen wurden als Pulver bezogen, das sowohl in Ethanol als auch in Chloroform löslich sein soll. Da Ethanol allerdings selbst das Schaltverhalten von Kanälen beeinflusst, war es als Lösungsmittel ungeeignet. Deshalb wurden die Substanzen in Chloroform gelöst (5 mg der Substanzen in 21,5 ml Chloroform), aliquotiert (1 ml Chloroform pro Eppendorf-Tube) und anschließend bei 50°C und 400 rpm im Shaker unter Stickstoffatmosphäre geschüttelt bis das Chloroform verdunstet war. Die Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

Vor jeder Messung wurde das Pellet in 50 µl DMSO aufgenommen (Konzentration 10 mM) und im Shaker bei 35°C geschüttelt bis keine weißen Flocken mehr sichtbar waren. Anschließend wurde die gewünschte Menge in externer Lösung aufgenommen. Um eine gleichmäßige Wirkung zu erhalten, war es sehr wichtig, die Lösung jeweils erst kurz vor der

Messung zuzubereiten und innerhalb von 30 min zu verbrauchen. In allen Experimenten war die maximale DMSO-Konzentration $\leq 0,1\%$. Um unspezifische Wirkungen durch das Lösungsmittel auszuschließen, wurden Kontrollexperimente mit 0,1%-iger DMSO-Lösung in verschiedenen Messkonfigurationen (Whole-Cell $n = 9$, Single-Channel $n = 7$) durchgeführt.

m-3M3FBS

Vom PLC-Aktivator m-3M3FBS (Sigma, Deisenhofen) wurde eine Stocklösung (50 mM) in DMSO hergestellt und bei -20°C aufbewahrt. Vor der Messung wurde die gewünschte Menge in externer Lösung aufgenommen. In den Experimenten war die maximale DMSO-Konzentration $\leq 0,1\%$.

2.3.5 Die Versuchsdurchführung

Präparation der Zellen

3 - 4 h vor den Versuchen wurden die transfizierten HEK-Zellen passagiert und auf verschiedene Petrischalen verteilt. So erhielt man einzeln liegende Zellen, wie man sie für Whole-Cell-Messungen benötigt. Nach 2 - 3 h hafteten sie wieder fest am Boden. Die Petrischale mit den Zellen wurde erst kurz vor jeder Messung aus dem Inkubator genommen. Das Nährmedium wurde abgekippt und durch dreimaliges Waschen gegen die Badlösung ausgetauscht. Anschließend wurde die Petrischale in den Objektisch des Mikroskops eingesetzt und die Erdelektrode so befestigt, dass sie in die Badlösung tauchte.

Füllen der Pipetten

Die Pipette wurde mit Hilfe einer 1 ml-Spritze, auf der sich ein Spritzenfilter mit einem Filament befand, luftblasenfrei befüllt. Danach wurde die Pipette über die chlorierte Pipettenelektrode geschoben und so in den Pipettenhalter eingespannt, dass die Elektrode Kontakt mit der Pipettenlösung hatte.

Auswahl der Zelle

Nachdem die Vorbereitungen getroffen waren, wurde unter dem Mikroskop eine geeignete Zelle ausgewählt. Für die Untersuchungen an den Neuronen wurden einzeln liegende Zellen ausgesucht, die sich visuell als vitale Pyramidenzellen identifizieren ließen (siehe Abschnitt 2.2).

Transient transfizierte HEK-Zellen wurden anhand der Fluoreszenz ausgesucht. Wichtigstes Kriterium für die Auswahl für Whole-Cell-Messungen war eine einzeln liegende, grün leuchtende Zelle, die keinen Kontakt zu anderen Zellen besaß. Außerdem sollte die Zelle klein sein und eine runde Form besitzen, da diese Zellen besonders gute elektrische Eigenschaften besitzen. Für Einzelkanal-Messungen brauchen die Zellen nicht einzeln zu liegen, so dass ein Splitten vor Messbeginn nicht nötig war.

Erreichen eines Gigaseals

Das Filament wurde mit Messlösung befüllt und mit Hilfe des Mikromanipulators in die Nähe der Zelle gebracht. Die Spitze des Filaments sollte sich bei 40facher Vergrößerung knapp außerhalb des Sichtfeldes befinden, damit bei Betätigung der Saugpumpe kein mechanischer Reiz auf die Zellen ausgeübt wurde und sich dadurch das Seal verschlechterte. Außerdem sollten dadurch keine mechanosensitiven Kanäle geöffnet werden.

An die Pipette wurde über das Schlauchsystem ein leichter Überdruck angelegt, damit die Pipettenspitze beim Eintauchen nicht durch Partikel in der Badlösung verstopfte. Der Verstärker war in den Voltage-Clamp-Modus geschaltet (Seal-Test = 10 mV, Whole-Cell: Gain = 1 mV/pA, Einzelkanal: Gain = 10 mV/pA). Die Pipettenspitze wurde mit Hilfe des 3D-Manipulators unter die Oberfläche der Badlösung abgesenkt und unter Monitorkontrolle mit Hilfe des Mikromanipulators in die Nähe der Zelle gebracht. Jetzt wurde der Nullabgleich am Verstärker durchgeführt, um das Offset-Potential zu korrigieren. Sobald die Pipettenspitze die Zellmembran erreicht hatte, war am Oszilloskop eine leichte Abnahme des Signals, d.h. eine Zunahme des Widerstandes zu beobachten. Durch Anlegen eines Unterdrucks an die Pipette erreichte man nun nach kurzer Zeit die Bildung eines Gigaseals mit einem Widerstand von über 1 G Ω (= Cell-Attached-Konfiguration). Kapazitive Ströme der Pipette bzw. des Pipettehalters wurden durch Regulation von „C-Fast“ am Verstärker ausgeglichen.

Anschließend wurde am Computer auf „Membran-Test“ umgestellt. Um einen Durchbruch in den Whole-Cell-Modus zu ermöglichen, wurde nun ein kurzer aber kräftiger

Unterdruckpuls appliziert. Der Durchbruch der Membran war an einer Erniedrigung des Widerstandes und einer starken Zunahme der kapazitiven Artefakte zu erkennen. Der Zugangswiderstand betrug für die Neuronen $< 15 \text{ M}\Omega$ und für die HEK-Zellen $< 10 \text{ M}\Omega$ und die Zellkapazität je nach Zellgröße 10-20 pF. Zusätzlich zum Einstellen der Kapazitätskompensation am Verstärker wurde zum schnelleren Umladen der Membran eine aktive Kompensation (Serien-Widerstand-Kompensation) von 75 - 80% zugeschaltet.

Um eine vollständige Durchmischung der Zelle mit Pipettenlösung zu erreichen, wurden die Messungen erst 5 min nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration gestartet.

Tabelle 2.9. Eingestellte Sampling- und Filterfrequenzen und Amplifier-Feedback bei verschiedenen Patch-Konfigurationen

Konfigurationen	Samplingfrequenz / kHz	Filterfrequenz / kHz	Amplifier-Feedback
Whole-Cell	20	5	Feedback über Widerstand
Einzelkanal	100	10	kapazitives Feedback

2.3.6 Auswertung und Darstellung

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Alle Graphiken und Histogramme wurden in OriginPro 7G (Origin Lab Corp, Northampton, MA, USA) erstellt. Die Kurven wurden entweder mit der OriginPro 7G-Software oder pCLAMP9.2 gefittet. Die statistischen Analysen wurden je nach Fragestellung unter Benutzung von einem Ein-Wege-ANOVA, dem sich ein Tukey's Test anschloß, oder gepaartem oder ungepaartem t-Test (Signifikanz von $p < 0.05$) durchgeführt.

Die Einzelkanal-Daten wurden mit Standardfunktionen der pCLAMP9.2-Software analysiert (Level- und Jump-Detection, Offenwahrscheinlichkeits-Histogramme, Dwell-Time-Histogramme) und anschließend in OriginPro 7G graphisch dargestellt.

Dosis-Wirkungskurven

Um einen Zusammenhang zwischen den Konzentrationen verschiedener Substanzen und der Stromantwort zu ermitteln, wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt. Dabei wurden

zunächst die entsprechenden Stromwerte aus Whole-Cell-Messungen bestimmt und auf den maximalen Strom zu Beginn der Messung (I_{\max}) normiert. Um die relative Stromreduktion zu erhalten, wurde der Stromwert nach Blockade mit einem spezifischen Kanal-Blocker mit maximaler Wirkung (GIRK: 2 mM Ba^{2+} , MaxiK: 10 mM TEA) jeweils noch abgezogen. Auf diese Weise war es möglich, den minimalen Strom (I_{\min}) beim Errechnen der Fit-Kurve gleich Null zu setzen.

Beim GIRK wurde der Strom mit einer linearen Hill-Dosis-Gleichung

$$y = I_{\min} + (I_{\max} - I_{\min}) / (1 + (x / IC_{50}))^h \quad (2.1)$$

angepaßt, während für den MaxiK eine logarithmische Darstellung der Dosis-Wirkungs-Gleichung

$$y = \frac{1}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x) \cdot h}} \quad (2.2)$$

verwendet wurde.

Die IC_{50} ist für beide Gleichungen identisch, allerdings ergibt die logarithmische Transformation ein asymmetrisches Fehlerintervall, wodurch die Fehlerbetrachtung verbessert wird (www.graphpad.com/curvefit).

Bei den Gleichungen steht I_{\max} für den maximalen Strom, I_{\min} für den minimalen Strom, EC_{50} für die halb-maximale inhibitorische Konzentration und h für den Hill-Koeffizient. Der Hill-Koeffizient gibt im Diagramm die Steilheit der Kurve an und einen Hinweis darauf, wie viele Moleküle der Substanz binden. I_{\max} und I_{\min} konnten in meinen Messungen als „fest“ gesetzt werden, da durch die entsprechenden Normierungen der maximale Strom nicht größer als 1 sein konnte und der minimale Strom 0 sein musste.

Dwell-Time-Histogramme

Um Einzelkanal-Aufnahmen zu analysieren und die Zeitkonstanten des Kanalschaltens zu erkennen, wurden Dwell-Time-Histogramme („Verweildauer-Histogramme“) erstellt. Sie stellen die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Aufenthaltszeiten in den verschiedenen Stromniveaus (Geschlossen- und Offen-Levels) einer Zeitreihe dar. Das Histogramm entsteht, indem mit der pCLAMP9.2-Software abgezählt wird, wie häufig der Strom für eine bestimmte Verweildauer auf dem Stromniveau c (Geschlossen-Level) bzw. o_1, \dots (Offen-Level $_1, \dots$) verweilt. Diese Zahl N wird gegen t aufgetragen.

Die y-Achse wurde durch Bildung der Quadratwurzel transformiert, wodurch die Unterschiede zwischen hohen und niedrigen Besetzungen verkleinert werden. Um die vorhandenen Zeitkonstanten besser erkennen zu können, wurde auf der Abszisse eine Einteilung mit exponentiell wachsenden Intervalllängen verwendet (Sigworth & Sine, 1987). Dann entstehen charakteristische Histogramme, bei denen die Anzahl der Maxima der Kurve gleich der Anzahl der Zeitkonstanten ist.

Anschließend konnten die Dwell-Time-Histogramme zur Verdeutlichung der einzelnen Maxima und Minima mit folgender Exponentialfunktion der pCLAMP9.2-Software angefitet werden:

$$f(t) = \sum_{i=1}^n P_i \cdot e^{[\ln(t) - \ln(\tau_i)]} \cdot e^{\ln(t) - \ln(\tau_i)} \quad (2.3)$$

2.4 Das konfokale Mikroskop

Für die Erstellung der konfokalen Bilder wurde das Laser-Scanning-Microscope LSM 510 (Zeiss, Jena) in Kombination mit einem inversen Axiovert 200 M (Zeiss) und dem Physiologie-Modul (Zeiss) verwendet. Als Objektiv diente ein Öl-Immersions-Objektiv mit vierzigfacher Vergrößerung (Plan-Neofluar 40x / Apertur 1.3 Oil). Das Scan-Modul ermöglichte eine Auflösung von 2048 x 2048 Pixeln mit einer Datentiefe von 8 bit.

Für die Messungen wurden folgende Einstellungen verwendet:

- Anregungswellenlänge des Argon-Lasers: 488 nm
- Hauptfarbteiler: 488 nm
- Pinhole 66 μm (1.0 Airy units), vorgeschalteter Longpassfilter LP 505 nm

Die Zellen wurden 2 - 3 Tage nach Transfektion in mit Poly-D-Lysin beschichtete Glasbodenschalen umgesetzt. Zur Beschichtung wurde jede Schalen mit 2 - 3 ml Lösung (Polylysin 1:10 mit PBS verdünnt) versetzt. Bis zum Gebrauch wurden die Schalen im Kühlschrank gelagert.

2.5 Die Ca^{2+} -Elektrode

Da Ca^{2+} für die Aktivierung des MaxiK eine so große Rolle spielt, ist es wichtig, die freie Ca^{2+} -Konzentration in der internen Lösung genau bestimmen zu können. Dies geschah mit Hilfe von Ca^{2+} -Elektroden. Dafür wurde eine semipermeable Membran, die durchlässig für Ca^{2+} ist (Calcium Ionophore II-Membrane A, Selectophore[®], Nr. 21189; Fluka Chemie, Buchs, Schweiz), in Kombination mit einem hochohmigen Verstärker (Eigenbau) verwendet. Zur Eichung der Elektroden wurden vier Eichlösungen benutzt:

- E2: 10 mM (= 10^{-2}) CaCl_2
 - E3: 1 mM (= 10^{-3}) CaCl_2
 - E4: 100 μM (= 10^{-4}) CaCl_2
 - E5: 10 μM (= 10^{-5}) CaCl_2
- } jeweils + 150 mM KCl
und in Plastikgefäßen

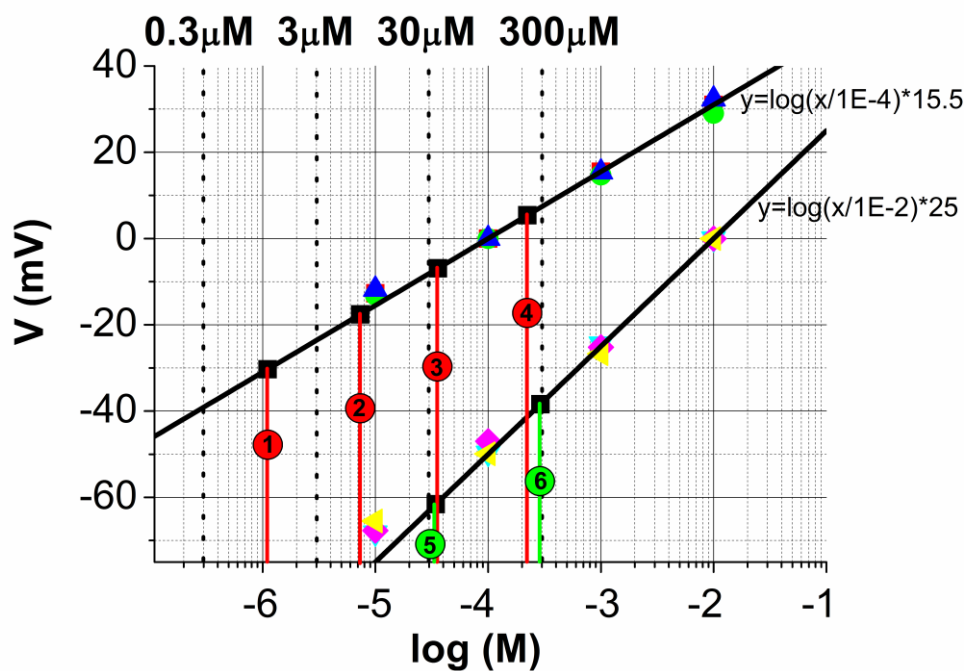


Abbildung 2.4. Ca^{2+} -Eichkurven, ermittelt von zwei Ca^{2+} -Elektroden.

Zunächst wurden mit Hilfe von Eichlösungen die Eichgeraden der beiden Elektroden bestimmt (die roten, grünen und blauen Punkte entsprechen drei Messungen an der ersten Elektrode; die gelben, rosa und hellblauen Punkte entsprechen drei Messungen an der zweiten Elektrode). Anschließend wurden die Ca^{2+} -Werte der internen MaxiK-Lösungen anhand der Referenzgeraden bestimmt (schwarze Quadrate und rote bzw. grüne Linien) und mit den Ca^{2+} -Sollwerten (gestrichelte Linien für 300 μM , 30 μM , 3 μM und 0,3 μM Ca^{2+}) verglichen. Die Zahlen 1 - 4 auf den roten Loten entsprechen den Messungen der MaxiK-Lösungen an der ersten Elektrode (0,3 μM (1), 3 μM (2), 30 μM (3), 300 μM (4)), die Zahlen 5 - 6 auf den grünen Loten entsprechen den Messungen der MaxiK-Lösungen an der zweiten Elektrode (30 μM (5), 300 μM (6)).

Da sich für jede Elektrode eine andere Eichgerade ergibt, wurden zur Kontrolle zwei Ca^{2+} -Elektroden gebastelt. Für die erste wurde E4 (obere Gerade in Abbildung 2.4) und für die zweite E2 (untere Gerade in Abbildung 2.4) ebenfalls in die Elektrode gefüllt und diente daher jeweils als Standardlösung. Alle Messungen erfolgten bei 21°C nach 5 min Equilibrierungszeit. Zwischen den Lösungen wurde immer wieder mit der Standardlösung der Nullabgleich durchgeführt. Für jede Eichlösung wurde die Spannung bestimmt und gegen die entsprechende Ca^{2+} -Konzentration aufgetragen (farbige Punkte in Abbildung 2.4). Anschließend wurde aus den verschiedenen Punkten jeweils einer Elektrode die Steigung der Eichgerade bestimmt. Es ergaben sich nach Nernst folgende Steigungen:

- für die erste Elektrode:
$$y = \log\left(\frac{x}{10^{-4}}\right) \cdot 15,5 \quad (2.4)$$

- für die zweite Elektrode:
$$y = \log\left(\frac{x}{10^{-2}}\right) \cdot 25 \quad (2.5)$$

Anschließend wurden die internen Lösungen - die für die Messungen am MaxiK verwendet werden sollten - auf ihren Ca^{2+} -Gehalt getestet. Dafür wurde wieder die Spannung am Verstärker gemessen und anschließend anhand der entsprechenden Gleichungen die Ca^{2+} -Konzentrationen errechnet. Trägt man die Werte in die Grafik in Abbildung 2.4 ein, so sieht man, dass beide Eichelektroden etwa die gleichen Werte anzeigen. Dabei stimmten die höheren Ca^{2+} -Konzentrationen ($300 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$) mit den Soll-Werten sehr genau überein, während es bei den niedrigeren Konzentrationen ($3 \mu\text{M}$, $0,3 \mu\text{M}$) leichte Abweichungen gab (statt $0,3 \mu\text{M}$ $1,1 \mu\text{M}$ gemessen, statt $3 \mu\text{M}$ $7,3 \mu\text{M}$ gemessen).

Die Lösungen mit $> 10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} wurden in Glas- und mit $< 10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} in Plastikgefäßen aufbewahrt. Die Quasi- Ca^{2+} -freien Lösungen wurden mit BAPTA gepuffert. Um die freie Ca^{2+} -Konzentration zu berechnen, wurde das Programm WinMAXC (C. Patton, Stanford University, Palo Alto, CA, USA) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Messungen an akut isolierten, neokortikalen Pyramidenzellen

3.1.1 Wirkung von U73122 und U73343 auf GIRK-Kanäle

Die ersten Experimente in diesem Abschnitt zeigen die Wirkung von U73122 und U73343 auf GIRK-Kanäle von akut dissoziierten Pyramidenzellen aus dem sensomotorischen Kortex von Ratten.

Da die Neurone viele verschiedene Ionenkanäle besitzen - auch verschiedene K^+ -Kanäle - mussten die zu untersuchenden GIRK-Kanäle zuerst gezielt aktiviert werden. Dies geschah auf zwei Wegen: Im Gegensatz zu den durch Depolarisation aktivierten Kationen-Kanälen sind die K^+ -Kanäle der Kir-Familie - zu der auch der GIRK gehört - bei Hyperpolarisation aktiviert, also bei Potentialen, die negativ vom eingestellten K^+ -Gleichgewichtspotential (E_K) liegen (Lu, 2004). Deshalb wählt man für kontinuierliche Messungen eine Spannung, die möglichst weit von E_K entfernt ist, so dass genug Strom fließt, und die andererseits die Stabilität des Gigaseals noch unbeeinträchtigt lässt. Um GIRK-Ströme bei Spannungen von -70 bis -80 mV messen zu können, habe ich daher deutlich erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentrationen verwendet, bei denen das Umkehrpotential bei etwa -20 mV lag.

Zur Unterscheidung innerhalb der Kir-Familie wurden die GIRK-Kanäle durch Baclofen aktiviert. Baclofen ist ein Agonist am G-Protein-gekoppelten $GABA_B$ -Rezeptor und erhöht deutlich den Einwärtsstrom des GIRK. Na^+ -Kanäle wurden durch Gabe von 1 μM TTX in der externen Lösung blockiert (siehe Abschnitt 2.3.4). Im Abschnitt 3.2.8 wird gezeigt, dass der MaxiK-Kanal von U73122 und U73343 blockiert wurde. Eine Aktivierung des MaxiK in den Pyramidenzellen konnte aber unter diesen Messbedingungen ausgeschlossen werden. Zum einen aktiviert er als auswärts-gleichrichtender Kanal nur bei Depolarisation. Zum anderen benötigt er entsprechend hohe Konzentrationen von freiem Ca^{2+} , die in der verwendeten Pipettenlösung aber durch EGTA gepuffert waren.

Die Abbildungen 3.1A+B zeigen typische Whole-Cell-Messungen bei einem konstanten Haltepotential von -70 mV. Nach Applikation von 20 μM Baclofen kam es zu einer Zunahme des Einwärtsstroms. Als Zeichen der vermehrten Kanalöffnungen nahm auch die Rauschamplitude zu. Typisch für den GIRK ist eine ausgeprägte Desensitisierung, die - in Anwesenheit von Baclofen - nach initialer Aktivierung zu einer deutlichen Stromabnahme führt (siehe Abschnitte 1.2.2, 3.2.2). Bei Erstellen einer Dosis-Wirkungskurve kann es dadurch zu Problemen kommen, da sich die Desensitisierung mit der blockierenden Wirkung von U73122 bzw. U73343 überlagern kann. Deshalb habe ich die Desensitisierung durch

Gabe von $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (300 μM) - einem nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogon - in der Pipettenlösung unterdrückt (Sickmann & Alzheimer, 2003).

Nachdem der Strom über einige Zeit konstant geblieben ist (Steady-State), habe ich U73122 (Abbildung 3.1A) bzw. U73343 (Abbildung 3.1B) in steigender Konzentration (0,3 bis 10 μM) in die Badlösung gegeben. Dosisabhängig kam es zu einer graduellen Abnahme sowohl des Stroms als auch des Rauschens. Auffällig war, dass die Wirkung von U73122 bzw. U73343 über die Baclofenantwort hinausging. Da unter den vorliegenden Messbedingungen wahrscheinlich keine weiteren Ionenkanäle aktiv waren, müssen die GIRK schon zu Beginn der Messung vor der Baclofengabe aktiviert gewesen sein. GIRK-Kanäle gehören nicht zu den konstitutiv aktiven Kanälen wie z.B. IRK oder ROMK, können aber trotzdem eine Basal-Aktivität zeigen, die unter meinen Versuchsbedingungen durch $\text{GTP}\gamma\text{S}$ deutlich verstärkt war.

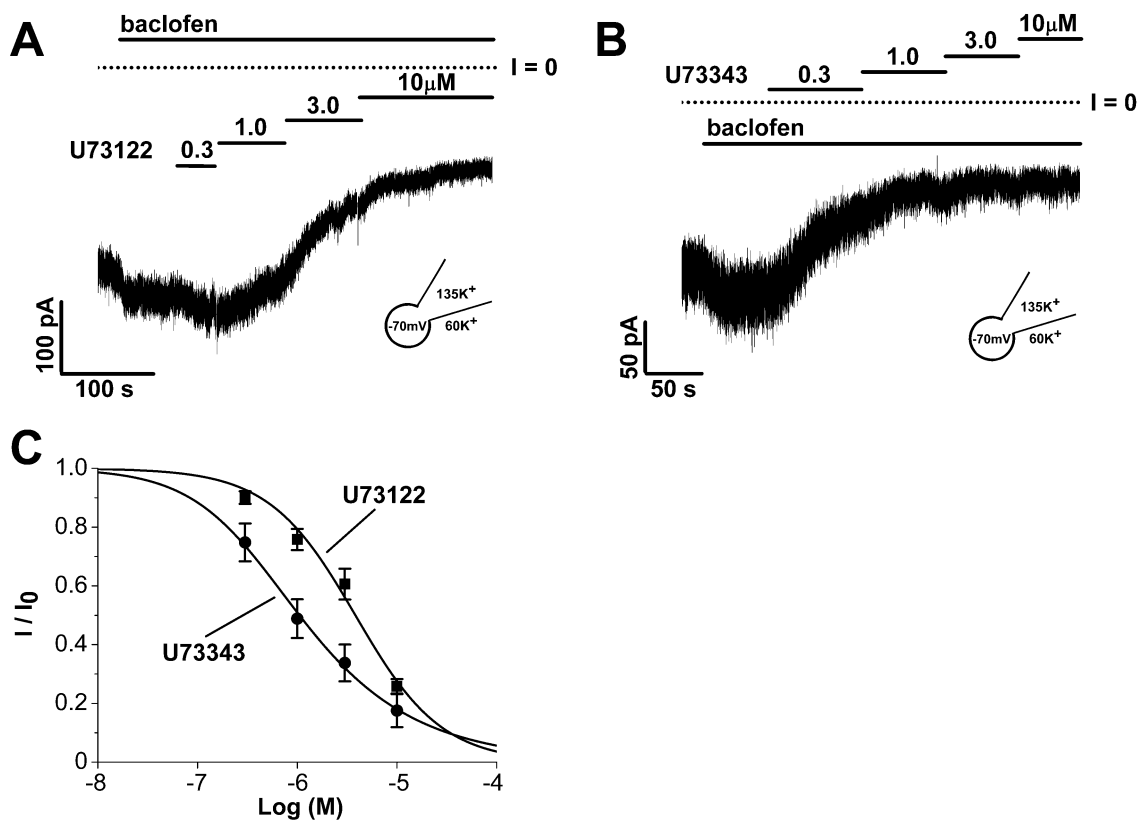


Abbildung 3.1. Wirkung von U73122 und U73343 auf GIRK-Kanäle von neokortikalen Pyramidenzellen.

Die Whole-Cell-Messungen wurden an akut dissoziierten Pyramidenzellen durchgeführt. Die K^+ -Konzentrationen von Bad- und Pipettenlösung sind in den Insets abgebildet (Abb. A, B).

(A), (B) Diese Aufnahmen zeigen typische Messungen bei einem konstanten Haltepotential von -70 mV . Die GIRK-Ströme wurden durch $20\text{ }\mu\text{M}$ Baclofen aktiviert. Nach Erreichen eines Steady-States wurden U73122 (A) bzw. U73343 (B) in aufsteigender Konzentration von 0,3 bis $10\text{ }\mu\text{M}$ appliziert.

(C) Dosis-Wirkungskurven wurden für U73122 ($n = 13$) und U73343 ($n = 11$) nach Normierung auf die maximale Antwort nach Baclofengabe berechnet. Die halbmaximalen inhibitorischen Wirkungs Dosen (IC_{50}) sind $3,9\text{ }\mu\text{M}$ für U73122 und $0,4\text{ }\mu\text{M}$ für U73343.

Um einen Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von U73122 bzw. U73343 und der Stromantwort herzustellen, wurden Dosis-Wirkungskurven (Abbildung 3.1C) erstellt. Die entsprechenden Stromwerte wurden dafür aus Whole-Cell-Messungen wie in den Abbildungen 3.1A+B bestimmt. Die Kurve über die Datenpunkte wurde mittels der Hill-Gleichung (Gleichung 2.1) berechnet. U73122 hatte eine halb-maximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von $3,89 \pm 2,3 \mu\text{M}$, die IC_{50} von U73343 lag bei $0,37 \pm 0,07 \mu\text{M}$.

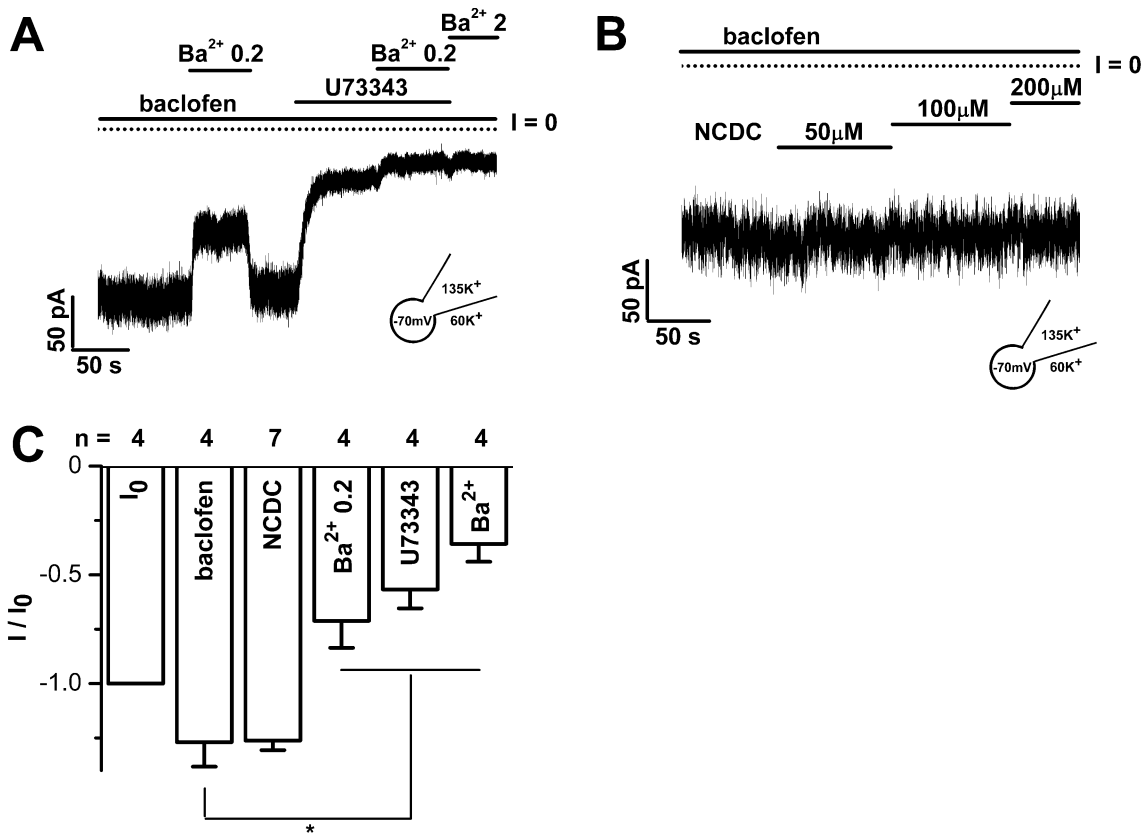


Abbildung 3.2. Wirkung verschiedener Blocker auf GIRK-Kanäle von Pyramidenzellen.

(A) Diese Aufnahme wurde bei einem konstanten Haltepotential von -70 mV durchgeführt. Die GIRK-Ströme wurden durch 20 μM Baclofen aktiviert. Nach Gabe von 200 μM Ba^{2+} wurde es mit Baclofenhaltiger Badlösung wieder ausgewaschen. Anschließend wurden 10 μM U73343, 200 μM Ba^{2+} und 2 mM Ba^{2+} appliziert.

(B) Diese Aufnahme zeigt eine Whole-Cell-Messung bei einem konstanten Haltepotential von -70 mV. Nach Aktivierung der GIRK-Ströme durch 20 μM Baclofen wurde NCDC in steigender Konzentration von 50 bis 200 μM appliziert.

(C) Dieses Histogramm stellt eine Zusammenfassung von Messungen wie in (A) dar, normalisiert auf den Strom I_0 vor Applikation von 20 μM Baclofen. I_{Baclofen} ist der maximale Einwärtsstrom nach Baclofen-Gabe. Die Wirkungen von 200 μM NCDC, 200 μM Ba^{2+} , 10 μM U73343 und 2 mM Ba^{2+} sind abgebildet. Die Anzahl der Messungen ist jeweils über den Balken angegeben. Die Signifikanz jedes Blockers wurde gegen I_{Baclofen} getestet. * $p < 0.05$

Um die Wirkprofile von U73122 bzw. U73343 besser einschätzen zu können, bietet sich der Vergleich mit bekannten Blockern der GIRK-Kanäle an. In höherer Konzentration (2 mM)

wirkt Ba^{2+} als unspezifischer Porenblocker der meisten K^+ -Kanäle. In einer Konzentration $\leq 200 \mu M$ gilt Ba^{2+} aber als relativ spezifischer Blocker einwärts-gerichteter K^+ -Kanäle (Sodickson & Bean, 1996; Bayliss et al., 1997; Takigawa & Alzheimer, 1999).

Die Abbildung 3.2A zeigt eine typische Whole-Cell-Messung bei einem konstanten Haltepotential von -70 mV . Zunächst wurden die GIRK-Kanäle durch $20 \mu M$ Baclofen aktiviert. Eine anschließende Applikation von $200 \mu M Ba^{2+}$ mit der Badlösung bewirkte in etwa eine Halbierung des Stroms, die sich im Auswaschversuch durch Spülung mit Baclofenlösung fast komplett wieder aufheben ließ. Gab man $10 \mu M U73343$ hinzu, wurde der Strom etwas stärker reduziert als durch Ba^{2+} in der niedrigen Konzentration. Applizierte man nun beide Substanzen zusammen, so ergab sich eine weitere Stromabnahme. Anschließende Gabe von Ba^{2+} in der hohen Konzentration von 2 mM zeigte kaum noch eine weitere Wirkung. Die Originalmessung zeigt ebenfalls, dass sich die Rauschamplitude ähnlich wie der Strom verhielt, so nahm bei Stromreduktion auch die Amplitude deutlich ab.

Das Histogramm in Abbildung 3.2C fasst die in Abbildung 3.2A beispielhaft illustrierten Experimente zusammen. Die Ströme wurden auf den Anfangsstrom der GIRK vor Applikation von Baclofen normalisiert. $200 \mu M Ba^{2+}$, $10 \mu M U73343$ und $2 \text{ mM } Ba^{2+}$ zeigten einen signifikanten Block der GIRK-Ströme ($200 \mu M Ba^{2+}$: 56%; $U73343$: 45%; $2 \text{ mM } Ba^{2+}$: 28%). In Abbildung 3.2A scheint es, als ob $U73343$ stärker wirken würde als $200 \mu M Ba^{2+}$. Allerdings zeigt die statistische Auswertung in Abbildung 3.2C keinen signifikanten Unterschied zwischen der Wirkung von $200 \mu M Ba^{2+}$ und $U73343$. Dies deutet darauf hin, dass beide Substanzen die gleiche Fraktion von Kanälen blockiert haben.

Um auszuschließen, dass die blockierenden Effekte von $U73122$ auf die Hemmung der PLC zurückzuführen waren, wurden weitere Kontrollen an den GIRK-Kanälen der Pyramidenzellen durchgeführt. NCDC (2-nitro-4-carboxyphenyl N,N-diphenylcarbamate) war die erste Substanz, für die in Thrombozyten gezeigt werden konnte, dass sie die Phospholipase C hemmt (Walenga et al., 1980). NCDC stammt aber aus einer anderen molekularen Klasse als $U73122$. Die Abbildung 3.2B zeigt eine typische Messung bei einem konstanten Haltepotential von -70 mV , in der - nach Aktivierung durch Baclofen - NCDC in Konzentrationen von $50 \mu M$, $100 \mu M$ und $200 \mu M$ appliziert wurde. Anders als durch $U73122$ erhielt man durch NCDC weder eine Strom- noch eine Amplitudenreduktion (Abbildung 3.2B+C). Zusammen mit der stark blockierenden Wirkung von $U73343$ spricht dieses Ergebnis dagegen, dass die Stromreduktion durch $U73122$ über die Hemmung der PLC zustande kommt.

3.1.2 Fehlende Wirkung von U73122 auf K_v -Kanäle

Um die Selektivität von U73122 zu untersuchen, wurde die Substanz an spannungsaktivierten K^+ -Kanälen (K_v) getestet.

Die K_v -Kanäle bilden eine heterogene Gruppe von auswärts-gleichrichtenden spannungsabhängigen K^+ -Kanälen (Übersicht in Yellen, 2002). Sie öffnen bei Potentialen, die positiv vom Ruhemembranpotential liegen, und fördern so durch den Auswärtsstrom die Repolarisation. In den meisten erregbaren Zellen mit kurzem Aktionspotential, wie unmyelinisierten Axonen, Motoneuronen und schnellen Skelettmuskeln, wird die hohe K^+ -Permeabilität durch die schnell aktivierenden K^+ -Kanäle der K_v -Klasse erreicht (Hille, 2001). Wie alle spannungsabhängigen K^+ -Kanäle bestehen die K_v -Kanäle aus vier α -Untereinheiten, die die Pore bilden (MacKinnon, 1995). Bis heute sind neun verschiedene α -Untereinheiten beschrieben, die mit K_v1-9 bezeichnet werden.

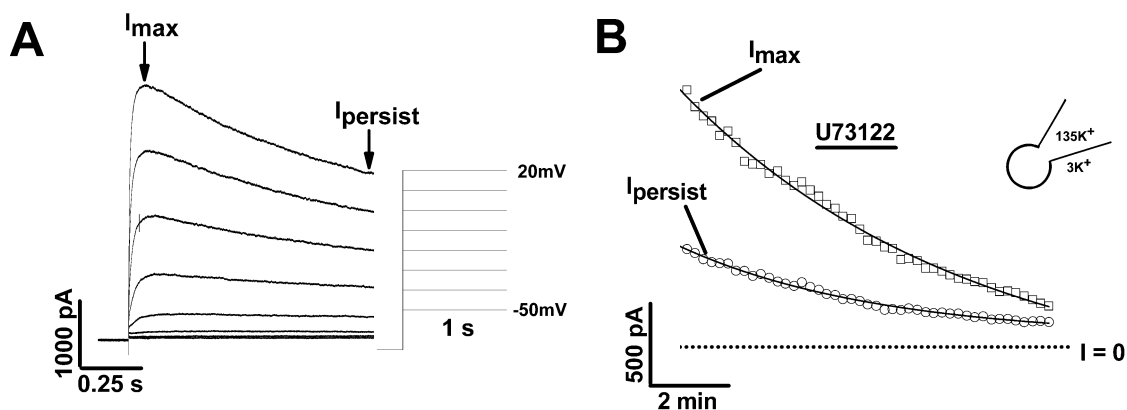


Abbildung 3.3. Wirkung von U73122 auf spannungsabhängige K_v -Kanäle von Pyramidenzellen.
 (A) Es wurden Treppen-Protokolle von -70 auf -50 bis +20 mV durchgeführt. Die Stromantworten wurden kontinuierlich alle 12 - 15 s aufgenommen. I_{max} markiert den größten Strom der +20 mV-Treppe, während $I_{persist}$ den Strom markiert, der nach 1 s jeweils übrig blieb.
 (B) „Rundown“ der Stromantwort über die Zeit. Die Abnahme von I_{max} (obere Kurve) und $I_{persist}$ (untere Kurve) lässt sich jeweils mit einer monoexponentiellen Formel beschreiben. Die Zeitkonstanten betragen für I_{max} 7,4 min und für $I_{persist}$ 5,08 min. Nach etwa 3,5 min wurde 1 μ M U73122 für 2 min appliziert und anschließend wieder Badlösung gegeben.

Als Messprotokoll wurden Spannungssprünge angewandt - wie in Abbildung 3.3A dargestellt. Da die K_v -Kanäle bei Depolarisation öffnen, also bei Potentialen, die positiv vom Ruhemembranpotential liegen, und bei den verwendeten K^+ -Konzentrationen das Umkehrpotential bei etwa -101 mV lag, wurden Spannungstreppen von -70 auf -50 bis +20 mV durchgeführt (Abbildung 3.3A).

Eine weitere Eigenschaft von spannungsabhängigen Kanälen wie den K_v , die bei den Messungen berücksichtigt werden musste, ist der sog. Rundown, d.h. eine Abnahme der

Stromantworten bei gleichem Testprotokoll während der Messzeit. Die Testprotokolle wurden alle 12 bis 15 s wiederholt. Nach etwa 3,5 min wurde 1 μ M U73122 für 2 min von extrazellulär appliziert und anschließend wieder ausgewaschen. Um eine mögliche Wirkung von U73122 zu erfassen, wurde jeweils der initiale Spitzenstrom bei +20 mV (I_{\max}) und der verbliebene Strom vor Ende des Spannungssprungs (I_{persist}) bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Die obere Kurve in Abbildung 3.3B setzt sich aus den Punkten von I_{\max} zusammen, während die untere die Punkte von I_{persist} darstellt. Die Datenpunkte ließen sich mit einer monoexponentiell abfallenden Kurve gut verbinden.

Alle vier durchgeführten Messungen zeigten das gleiche Ergebnis: Die monoexponentielle Abnahme beider Kurven wurde durch Applikation von U73122 nicht verändert. Daraus kann man schließen, dass die Substanz keine Wirkung auf die in dieser Messung erfassten spannungsabhängigen K^+ -Kanäle hatte.

3.2 Untersuchung verschiedener K^+ -Kanäle im heterologen Expressionssystem

3.2.1 Vergleich von nativen und transfizierten HEK-Zellen

Neuronen besitzen eine große Vielfalt unterschiedlicher Ionenkanäle, die sich mit pharmakologischen oder biophysikalischen Mitteln häufig nur schwer eindeutig identifizieren lassen. Angesichts dieser Schwierigkeiten besteht ein alternativer Ansatz darin, die interessierenden Kanäle in heterologen Expressionssystemen gezielt zu exprimieren. Dafür eignen sich beispielsweise die HEK293-Zellen, da sie weder spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle (Sievers, 2004) noch endogene Na^{2+} -Ströme (Huth, 2005) aufweisen. Allerdings besitzen sie wie alle Zellen endogene K^+ -Kanäle, um das Ruhemembranpotential stabilisieren zu können (Abbildung 3.4D).

Die Abbildungen 3.4A+B zeigen Vergleichsmessungen mit Rampenprotokollen von -100 bis +60 mV (A) bzw. bis +100 mV (B) an verschiedenen HEK-Zellen. Die eine Zelle wurde jeweils nativ gemessen (rote Kurve), während die zweite mit dem Kir2.1-Kanal (A) bzw. dem MaxiK (B) transfiziert war. In beiden Abbildungen ist ein deutlicher Unterschied zwischen nativer und transfizierter Zelle sichtbar. Während in Abbildung 3.4A v. a. der Einwärtsstrom des Kir2.1 - d.h. links vom Umkehrpotential (hier ca. -3mV) - wesentlich größer als der der nativen HEK-Zelle ist, besteht beim MaxiK eine große Differenz zur nativen HEK-Zelle v. a. beim Auswärtsstrom - also rechts vom Umkehrpotential (hier ca. -88 mV).

Um in diesen beiden Spannungsbereichen den Unterschied zwischen nativen und transfizierten HEK-Zellen zu verdeutlichen, wurde ein Histogramm erstellt (Abb. 3.4C), das verschiedene Experimente, ähnlich wie in Abb. 3.4A+B zusammenfasst. Bei -70 mV wurde der Strom der HEK-Zellen mit dem Strom von transfizierten Kir2.1-Kanälen verglichen. Während die Kir2.1 einen durchschnittlichen Strom von -4881 pA haben, zeigen die nativen HEK nur -32 pA. Bei +20 mV haben die mit MaxiK transfizierten HEK im Durchschnitt einen Strom von +662 pA, während die nativen HEK nur rund +22 pA zeigen. Offensichtlich sind also weder Kir2.1 noch MaxiK in den nativen HEK exprimiert.

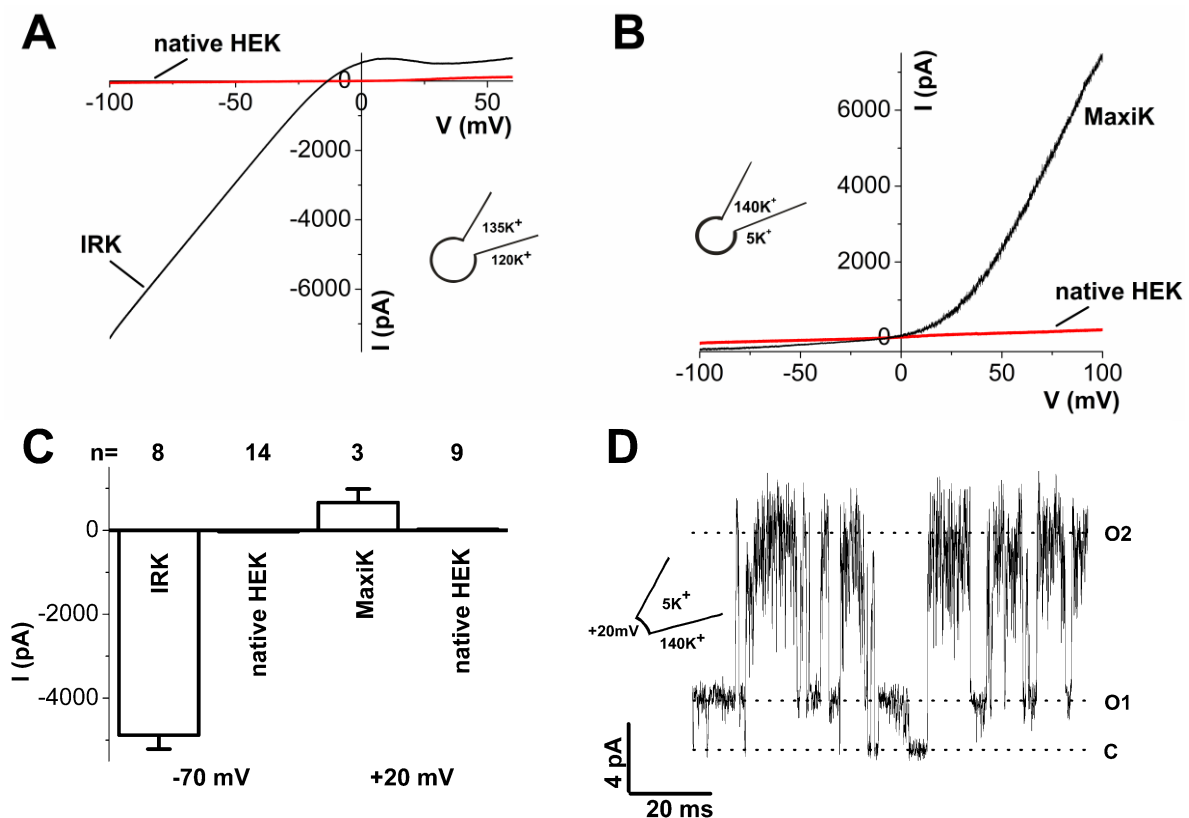


Abbildung 3.4. Vergleich der Ströme von transfizierten und nativen (untransfizierten) HEK293-Zellen.

Die Messungen wurden an nativen HEK293-Zellen und an HEK293-Zellen, die mit Kir2.1 (Abb. A) bzw. MaxiK (Abb. B, D) transfiziert waren, durchgeführt.

(A), (B) Diese Aufnahmen zeigen Whole-Cell-Messungen mit Rampen-Protokollen von -100 bis +60 mV (80 mV/s; A) bzw. -100 bis +100 mV (20 mV/s; B). Es werden die typischen Ströme einer nativen HEK-Zelle (rot) mit dem Strom einer Zelle, die mit dem Kir2.1-Kanal (A) bzw. dem MaxiK-Kanal (B) transfiziert ist (schwarz), verglichen.

(C) Dieses Histogramm zeigt eine Zusammenfassung von verschiedenen Messungen wie in (A). Es werden jeweils die Einwärtsströme bei -70 mV von nativen HEK-Zellen verglichen mit Zellen, die mit Kir2.1 transfiziert sind und bei +20 mV die Auswärtsströme von nativen HEK-Zellen mit Zellen, die mit dem MaxiK transfiziert sind. Die Anzahl der entsprechenden Messungen ist jeweils über den Balken angegeben.

(D) Einzelkanal-Messung in der Inside-Out-Konfiguration von einer HEK293-Zelle, die stabil mit der MaxiK α - und β 1-Untereinheit transfiziert war, bei einer Spannung von +20 mV. Man sieht neben dem MaxiK (O2), der einen Einzelkanalstrom von ca. 9,3 pA aufwies, noch Öffnungen von einem zweiten Kanaltyp mit deutlich geringerer Leitfähigkeit (O1). Die Kanalampplitude lag bei 2,9 pA, was zu einem endogen exprimierten K⁺-Kanal passen würde (C: Geschlossen-Level; O1, O2: Offen-Level).

Die Abbildung 3.4D zeigt eine Einzelkanal-Aufnahme in der Excised-Patch-Konfiguration von einer HEK-Zelle, die stabil mit der MaxiK α - und β_1 -Untereinheit transfiziert war. Dieses Experiment wurde mit gesättigten Ca²⁺-Dosen in der internen Badlösung (300 μ M) durchgeführt. Der MaxiK hat einen besonders großen Einzelkanal-Strom von über 9 pA bei einer Spannung von +20 mV. Die MaxiK-Öffnung wird durch die Linie O2 markiert. Manchmal fiel bei gleicher Spannung zusätzlich ein deutlich kleineres Stromniveau auf, das nur etwa 3 pA entspricht (O1). Dies passt zu einem intrinsischen K⁺-Kanal. Durch den deutlichen Stromunterschied sind sie vom MaxiK leicht zu unterscheiden. Bei Transfektionen mit Kanälen, die kleinere Einzelkanalleitfähigkeiten besitzen - wie z.B. die GIRK - könnten diese intrinsischen Kanäle zu Unterscheidungsproblemen führen. Allerdings gehören die meisten intrinsischen Kanäle der Gruppe der spannungsaktivierten K⁺-Kanäle (K_v) an, die eher bei Depolarisation als bei Hyperpolarisation aktiv sind, und so mit den Kir-Kanälen kaum verwechselt werden können.

3.2.2 Wirkung von U73122 und U73343 auf GIRK in Whole-Cell-Messungen

Die Experimente im HEK293-Expressionssystem sollen die Wirkungen des PLC-Inhibitors U73122 und seines PLC-inaktiven Analogs U73343 auf die GIRK- (Kir3.1/2) Kanäle (siehe Abschnitt 1.2.2) untersuchen, um einen Vergleich zu den Messungen an den dissoziierten Pyramidenzellen aus dem Neocortex der Ratte zu erhalten.

In HEK-Zellen wurde der bicistronische Kir3.1/3.2-Expressionsvektor zusammen mit dem 5HT_{1A}-Rezeptor transient exprimiert. Zwar kommen Homotetramere des GIRK in vivo wahrscheinlich vor (Corey & Clapham, 1998; Inanobe et al., 1999), sie produzieren allerdings nur geringe Ströme. Aus diesem Grund wurde ein Heterotetramer aus GIRK1 und GIRK2 - wie er auch in Neuronen vorkommt - transfiziert. Der Serotonin-Rezeptor war nötig, um die GIRK-Kanäle zu aktivieren. Das Signal vom Rezeptor wird über intrinsische G-Proteine der HEK-Zellen auf den GIRK übertragen (siehe Abschnitt 1.2.2).

Die Abbildung 3.5A zeigt eine typische Whole-Cell-Messung bei einem konstanten Haltepotential von -70 mV. Wie bei den Messungen an den Pyramidenzellen wurde für die GIRK - die bei Hyperpolarisation aktivieren - wieder eine Spannung gewählt, die möglichst weit von Umkehrpotential ($E_K = -3$ mV) entfernt ist, so dass ausreichend Strom fließt, und die andererseits das Gigaseal nicht beeinträchtigt (siehe Abschnitt 3.1.1). Nach Applikation von Serotonin (20 μ M) kam es zu einem schnellen und starken Anstieg des Einwärtsstroms, der über die Zeit wieder abnahm (Desensitisierung; siehe Abschnitte 1.2.2 und 3.1.1). Sobald ein

Steady-State erreicht war - der Strom also in etwa konstant blieb - wurde 10 μM U73122 gegeben, wodurch der Einwärtsstrom innerhalb von Sekunden um fast 90% abnahm. Anschließend wurden zum Vergleich und zur Kontrolle zwei weitere Substanzen gegeben, die als Blocker der GIRK bekannt sind, Tertiapin und Ba^{2+} . Tertiapin ist ein kurzes Peptid, das aus dem Gift der Honigbiene isoliert wurde (Xu & Nelson, 1993). Es ist ein hoch potenter und sehr selektiver Porenblocker der GIRK-Kanäle, der neben den Kir3.1/3.2- und Kir3.1/3.4-Heteromultimeren nur noch auf den ROMK wirkt (Jin & Lu, 1998; Kitamura et al., 2000; Kanjhan et al., 2005). Ba^{2+} dagegen ist in einer Konzentration von 2 mM ein unspezifischer Porenblocker der meisten - auch intrinsischen - K^+ -Kanäle (siehe Abschnitt 3.1.1). Weder 60 nM Tertiapin noch 2 mM Ba^{2+} zeigten eine signifikante zusätzliche Hemmung des Stroms, so dass 10 μM U73122 schon vorher fast vollständig die GIRK-Kanäle geblockt haben musste. Um zu zeigen, dass die Wirkung von U73122 PLC-unabhängig ist, wurde das Experiment mit dem PLC-inaktiven Analog U73343 (10 μM) wiederholt (Abbildung 3.5D).

In Whole-Cell-Messungen mit Rampenprotokollen zeigten Kir3.1/3.2-Kanäle - nachdem sie durch Serotonin aktiviert wurden - einen typischen starken einwärts-gleichrichtenden Strom, d.h. bei negativen Spannungen haben die Kanäle einen sehr großen Strom, der etwa am Umkehrpotential ($E_K = -3 \text{ mV}$) die Null durchläuft, aber im positiven Bereich kaum weiter ansteigt. Der Strom konnte fast komplett mit 10 μM U73343 im gesamten Spannungs-Bereich geblockt werden (Abbildung 3.5B).

Das Histogramm in Abbildung 3.5D fasst verschiedene Experimente wie in Abbildung 3.5A zusammen. Die Ströme sind auf den Anfangsstrom der GIRK vor Applikation von Serotonin normalisiert. Genau wie bei den frisch dissoziierten Pyramidenzellen besaßen einige Zellen eine Basal-Aktivität der GIRK (siehe Abschnitt 3.1.1) und hatten schon submaximale GIRK-Ströme vor Serotonin-Gabe, während andere erst durch Serotonin aktiviert werden mussten. Die Basal-Aktivität ist in über 90% abhängig vom freien $\text{G}\beta\gamma$ in der Zellmembran (Rishal et al., 2005). Peleg et al. (2002) haben festgestellt, dass diese Basal-Aktivität der GIRK umso größer ist, je höher die Expressionsdichte im heterologen Zellsystem ist. Es ist aber nicht möglich, konstant eine gleichmäßige Expression der Kanäle zu erhalten. Dies scheint der Grund zu sein, weshalb die Stromantwort vor Aktivierung mit Agonisten so unterschiedlich ausfiel. Deshalb zeigten der maximale Strom nach Applikation von Serotonin (I_{max}) und der desensitisierte Strom (I_{desens}) so große Schwankungen (Abbildung 3.5.D).

200 μM Ba^{2+} , 60 nM Tertiapin, 10 μM U73122 und 10 μM U73343 zeigten einen signifikanten Block der GIRK-Ströme in annähernd gleicher Stärke (bezogen auf I_{desens} : U73122: 13,5%; U73343: 13,5%; Tertiapin: 14,2%; 200 μM Ba^{2+} : 18%; 2 mM Ba^{2+} : 6,9%). Höhere Konzentrationen von Ba^{2+} (2 mM) blockten eine zusätzliche Fraktion von K^+ -Kanälen, die wahrscheinlich den intrinsischen K^+ -Kanälen der HEK-Zellen zugeordnet werden können.

U73122 und U73343 hatten weitgehend irreversible Wirkungen, denn es war nicht möglich, sie auszuwaschen (Auswaschversuch 30 min, n = 3 für jede Substanz).

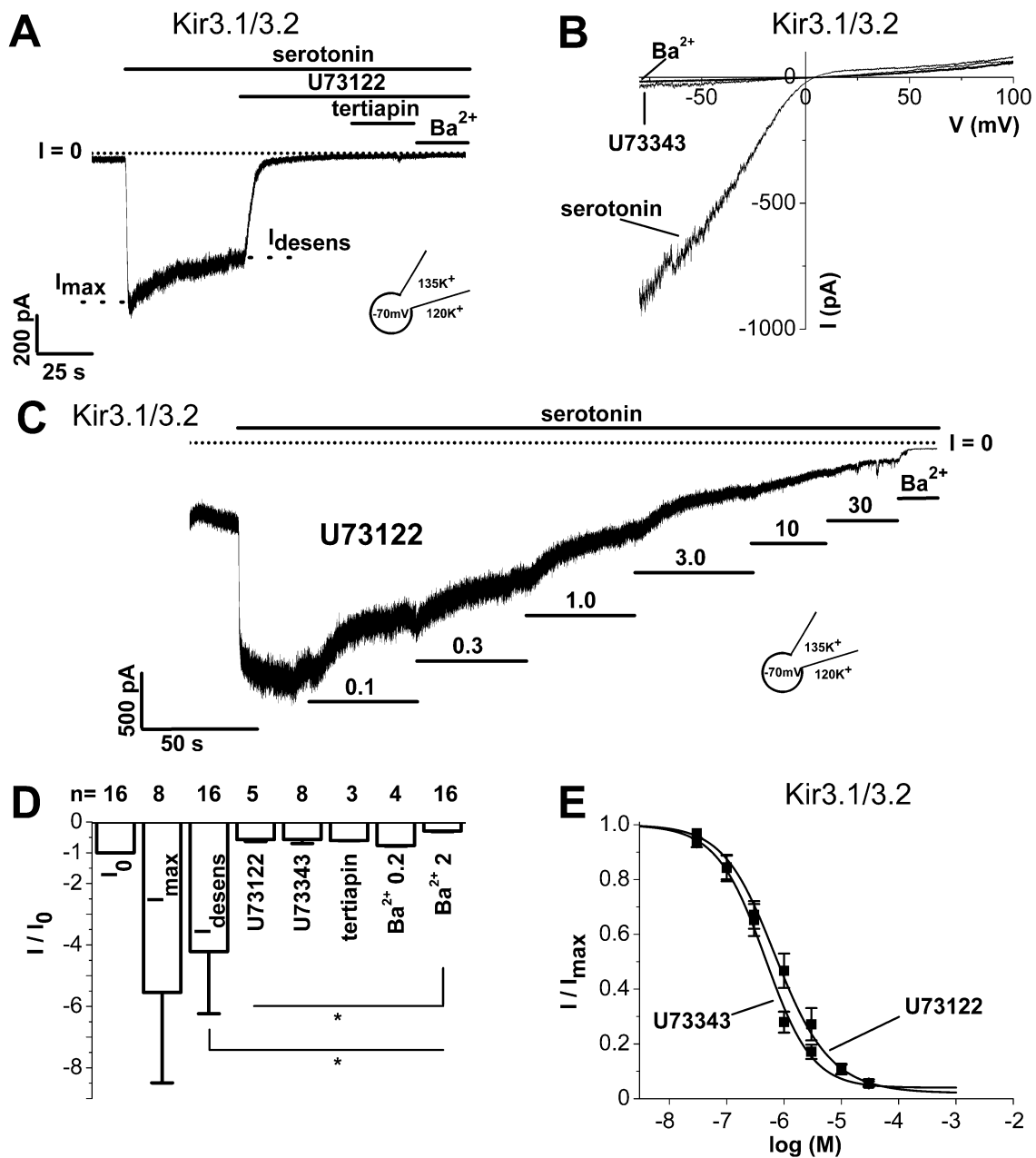


Abbildung 3.5. Wirkung von U73122 und U73343 auf GIRK (Kir3.1/2)-Kanäle.

Die Whole-Cell-Messungen wurden an HEK293-Zellen, die mit Kir3.1/2 und dem 5-HT_{1A}-Rezeptor transfiziert waren, durchgeführt.

(A) Diese Aufnahme zeigt eine Messung bei konstantem Haltepotential von -70 mV. Die GIRK-Ströme wurden durch 20 μM Serotonin aktiviert. Nach der Desensitisierung wurden 10 μM U73122, 60 nM Tertiapin und 2 mM Ba²⁺ über das Filament appliziert. Die gestrichelten Linien markieren den maximalen Strom (I_{max}) und den teilweise desensitisierten Strom (I_{desens}).

(B) Es wurden Spannungsrampen von -80 bis +100 mV (20 mV/s) erzeugt. Nach Aktivierung durch 20 μM Serotonin wurden die Ströme vor und nach Applikation von 10 μM U73343 aufgenommen. Um den Strom als Kontrolle komplett zu blockieren, wurde 2 mM Ba²⁺ gegeben.

(C) Diese Aufnahme wurde bei einem konstanten Haltepotential von -70 mV durchgeführt. Die GIRK-Ströme wurden durch 20 μM Serotonin aktiviert. Nach Erreichen eines Steady-State-Stroms wurde U73122 in aufsteigender Konzentration von 0,1 bis 30 μM gegeben. Als Kontrolle wurde 2 mM Ba²⁺ appliziert.

(D) Das Histogramm zeigt eine Zusammenfassung von Messungen wie in (A), normalisiert auf den Strom I_0 vor Applikation von 20 μM Serotonin. I_{max} ist der Spitzen-Einwärtsstrom, der zum Steady-State-Strom I_{desens} desensibilisiert. Die Wirkungen von 200 μM Ba^{2+} , 60 nM Tertiapin, 10 μM U73122, 10 μM U73343 und 2 mM Ba^{2+} sind zu sehen. Die Anzahl der Messungen ist jeweils über den Balken angegeben. Die Signifikanz jedes Blockers wurde gegen I_{desens} und Ba^{2+} (2 mM) getestet. * $p < 0.05$

(E) Dosis-Wirkungskurven wurden für U73122 ($n = 7$) und U73343 ($n = 7$) nach Normierung auf die maximale Antwort nach Serotoningabe berechnet. Die Stromdesensibilisierung wurde durch $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Gabe mit der Pipette verhindert. Die halbmaximalen inhibitorischen Wirkungskonzentrationen (IC_{50}) betragen 0,54 μM für U73122 und 0,55 μM für U73343.

Als nächstes wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung der GIRK-Hemmung durch U73122 und U73343 bestimmt. Die Abbildung 3.5C zeigt eine typische Messung bei einem konstanten Haltepotential von -70 mV. Um die Strom-Desensibilisierung nach maximaler Aktivierung durch Serotonin zu verhindern, wurde mit der Pipette $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (300 μM) - ein nicht-hydrolysierbares GTP-Analog - appliziert, wodurch es zu einer permanenten GIRK-Aktivierung ohne Desensibilisierung kommt (siehe Abschnitte 1.2.2, 3.1.1; Sickmann & Alzheimer, 2003; Sickmann et al., 2008). Nachdem der Strom über einige Zeit konstant geblieben ist (Steady-State), wurden U73122 (Abbildung 3.5C + E) bzw. U73343 (Abbildung 3.5E) in steigender Konzentration von 0,1 bis 30 μM hinzugegeben.

Dosisabhängig kam es zu einer schrittweisen Abnahme von Strom und Rauschen. Wie bei den Pyramidenzellen ging die Wirkung von U73122 deutlich über die Serotoninantwort hinaus, was wahrscheinlich wieder auf die Basal-Aktivität der GIRK zurückgeführt werden kann (siehe Abschnitt 3.1.1). Für U73122 und U73343 wurden aus Messungen wie in Abbildung 3.5C Dosis-Wirkungskurven erstellt. Dabei ergab sich für U73122 eine halb-maximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von $0,54 \pm 0,04 \mu\text{M}$ ($h = 0,8$) und für U73343 ein IC_{50} -Wert von $0,55 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ($h = 1,1$).

3.2.3 Wirkung von U73122 und U73343 auf GIRK in Einzelkanal-Messungen

Um mehr Informationen über den möglichen Wirkungsmechanismus des Blocks durch U73122 zu bekommen, wurden Einzelkanal-Messungen am GIRK in der Inside-Out-Konfiguration durchgeführt. In dieser Konfiguration sollten alle zytosolischen Komponenten der Zelle, die evtl. mit den beiden Substanzen interagieren, durch die interne Lösung ersetzt sein.

Die Abbildungen 3.6A und 3.7A zeigen typische Einzelkanal-Messung von GIRK-Kanälen in der Inside-Out-Konfiguration. Um einen Rundown auszuschließen, wurden Zeitreihen jeweils über

einen relativ langen Zeitraum dargestellt mit mehreren aktiven Kanälen, und zwar in Abbildung 3.6A mit mindestens drei und in Abbildung 3.7A mit mindestens zwei aktiven GIRK-Kanälen.

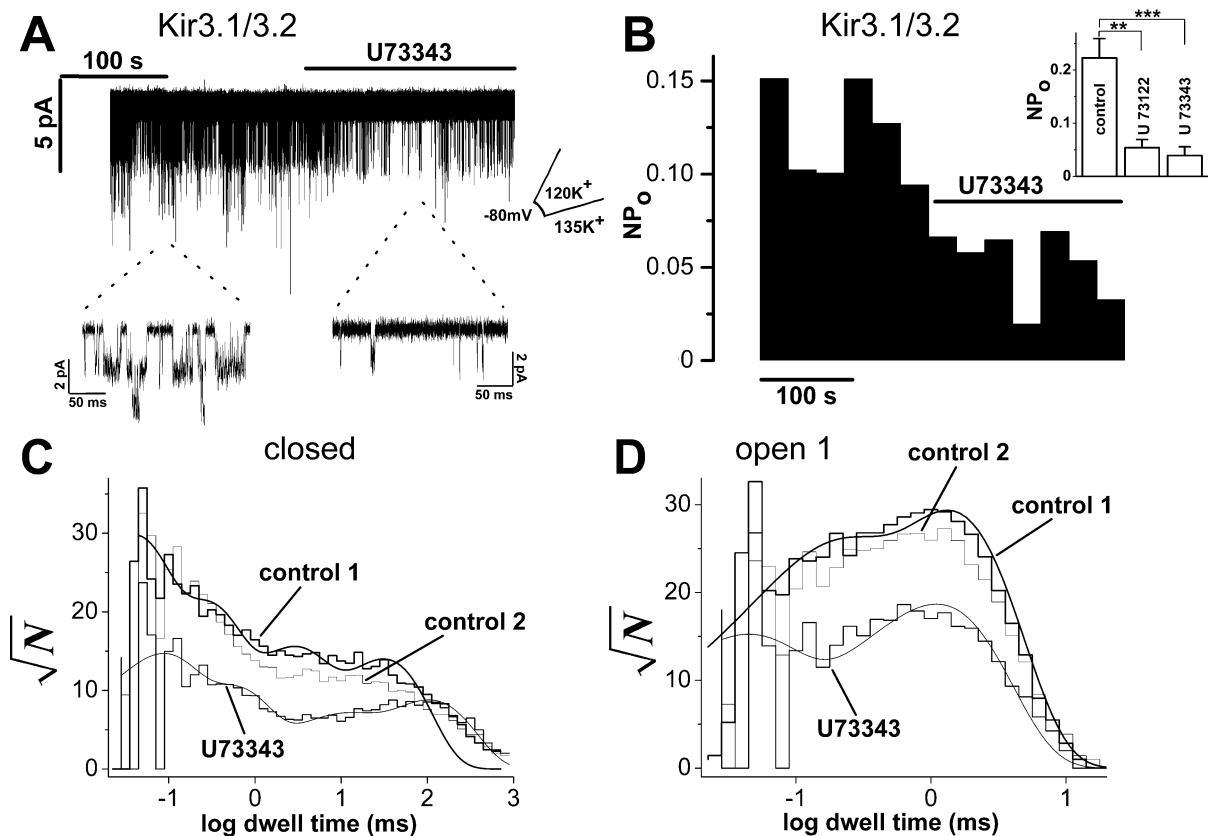


Abbildung 3.6. Wirkung von U73343 auf GIRK- (Kir3.1/3.2) Kanäle in Einzelkanal-Messungen.

An HEK293-Zellen, die mit Kir3.1/2 und dem 5-HT_{1A}-Rezeptor transfiziert waren, wurden Einzelkanal-Messungen in der Inside-Out-Konfiguration durchgeführt. Die K⁺-Konzentrationen von Bad- und Pipettenlösung sind im Inset abgebildet (Abb. A).

(A) Die Aufnahme zeigt eine Messung bei konstantem Haltepotential von -80 mV. In diesem Patch waren 3 Offen-Levels gleichen Abstands vorhanden. Die beiden Insets zeigen die Einzelkanal-Ereignisse in einer höheren Zeit-Auflösung. Nachdem die Offenwahrscheinlichkeit ein Steady-State erreicht hatte, wurde 10 μM U73343 in die Badlösung appliziert.

(B) Die Offenwahrscheinlichkeit (NP_o) für die 3 Offen-Levels der Messung in (A) ist in einem Offenwahrscheinlichkeits-Histogramm gegen die Zeit aufgetragen (Bin-Weite: 30 s). Das Inset fasst die mittlere NP_o für U73122 (n = 13) und U73343 (n = 7) zusammen (control, n = 20). ** p < 0.01, *** p < 0.001

(C), (D) Dwell-Time-Histogramme der Messung in (A) vor (control 1: 0 - 150 s und control 2: 150 - 300 s) und nach Applikation von 10 μM U73343 (340 - 490 s) für Geschlossen-Level (C) und Offen-Level 1 (D). Die Histogramme wurden mit der Gleichung 2.3 angepasst. Das beste Fit-Ergebnis ergab sich für die Geschlossen-Ereignisse mit vier Zeitkonstanten und für die Offen1-Ereignisse mit zwei Zeitkonstanten.

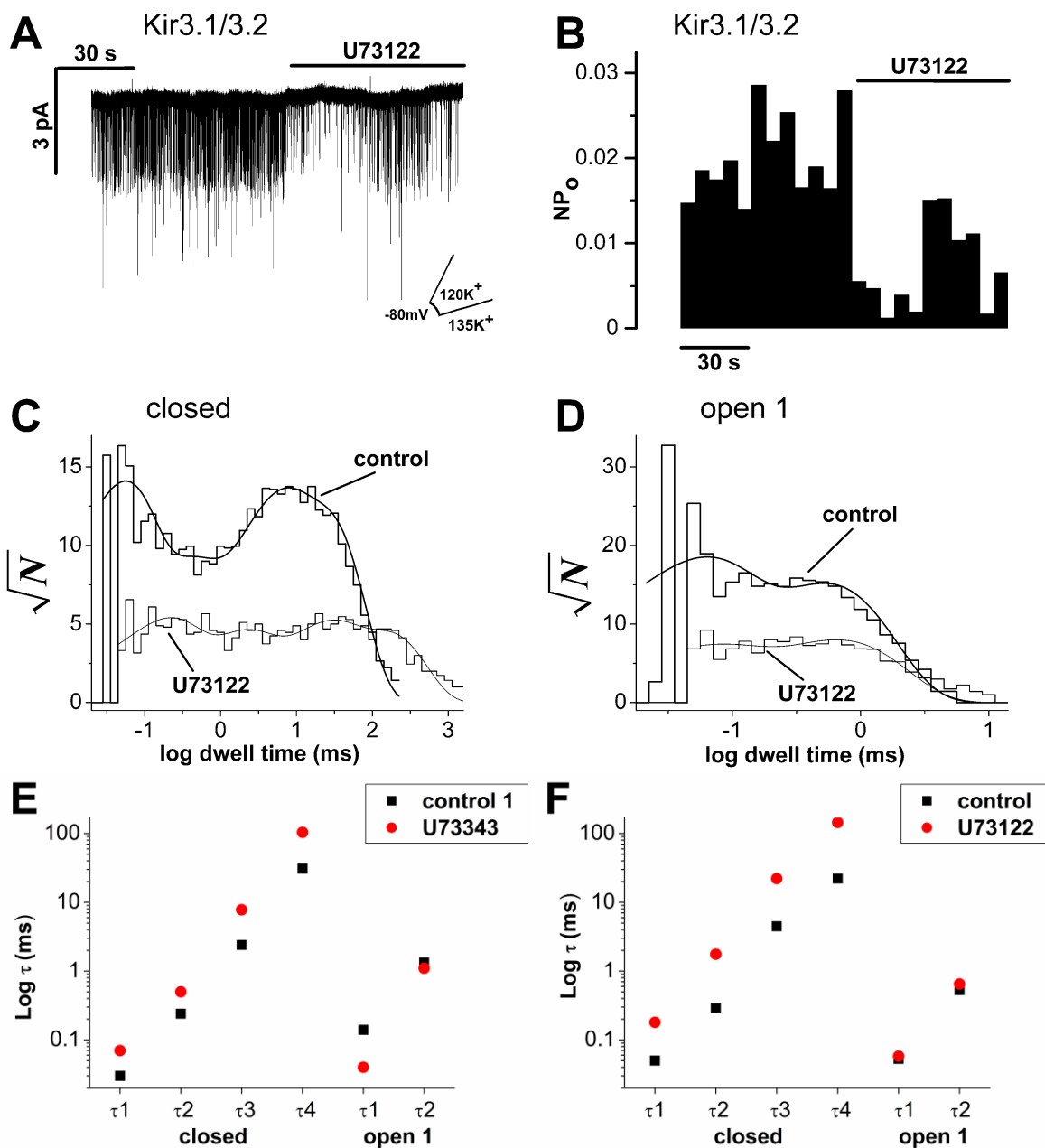


Abbildung 3.7. Wirkung von U73122 auf GIRK (Kir3.1/3.2)-Kanäle in Einzelkanal-Messungen.

(A) HEK293-Zellen, die mit Kir3.1/2 und dem 5-HT_{1A}-Rezeptor transfiziert waren, wurden in der Inside-Out-Konfiguration bei einem Haltepotential von -80 mV gemessen. In diesem Patch waren mindestens 2 Offen-Levels vorhanden. Nachdem die Offenwahrscheinlichkeit ein Steady-State erreicht hat, wurde 10 μM U73122 in die Badlösung appliziert.

(B) Die Offenwahrscheinlichkeit (NP_o) für die beiden Offen-Levels der Messung in (A) ist in einem Offenwahrscheinlichkeits-Histogramm gegen die Zeit aufgetragen (Bin-Weite: 6,4 s).

(C), (D) Dwell-Time-Histogramme der Messung in (A) vor (control: 0 - 60 s) und nach Applikation von U73122 (60 - 120 s) für Geschlossen-Level (C) und Offen-Level 1 (D). Die Kurven über den Histogrammen wurden mit Gleichung 2.3 errechnet. Das beste Fit-Ergebnis ergab sich für die Geschlossen-Ereignisse mit vier Zeitkonstanten und für die Offen1-Ereignisse mit zwei Zeitkonstanten.

(E), (F) Die Diagramme zeigen die Zeitkonstanten aus den Dwell-Time-Histogrammen (Abbildung 3.6C+D, 3.7C+D), jeweils vor (control) und nach Applikation von U73343 (E) bzw. U73122 (F).

In den beiden Insets in Abbildung 3.6A sind die Einzelkanal-Ereignisse in einer erhöhten Zeit-Auflösung dargestellt. Das linke Inset zeigt einen Ausschnitt aus der Kontrollperiode, während das rechte einen Ausschnitt aus der Periode unter U73343-Gabe zeigt. Typisch für den GIRK auf Einzelkanalniveau ist eine niedrige Offenwahrscheinlichkeit, die v. a. durch lange Geschlossen-Intervalle zustande kommt (Yakubovich et al., 2000) und ein Einzelkanalstrom von etwa 2 pA (Abbildung 3.6A). Wenn der Kanal öffnet, dann geschieht das meist in Form sogenannter kurzer Bursts, die man auch im Inset in Abbildung 3.6A erkennt (Slesinger et al., 1995; Yakubovich et al., 2000). Nachdem die Offenwahrscheinlichkeit in etwa einen Steady-State erreicht hat, wurden 10 μM U73343 (Abbildung 3.6A) bzw. 10 μM U73122 (Abbildung 3.7A) in die Badlösung appliziert, wodurch die Kanal-Aktivität deutlich abnahm.

Aufgrund der besseren Steuerbarkeit wurden U73122 und U73343 grundsätzlich über das Filament gegeben, d.h. in der Whole-Cell- und der Cell-Attached-Konfiguration von extrazellulär und in der Inside-Out-Konfiguration von der zytosolischen Seite der Zellmembran. Wegen des lipophilen Charakters des Lösungsmittels DMSO für die Substanzen macht die Applikation von intra- und von extrazellulär keinen Unterschied.

In den Histogrammen in Abbildung 3.6B und 3.7B ist die mit dem Programm Clampfit ermittelte Offenwahrscheinlichkeit NP_o für die jeweils aufgezeichneten Spuren (Abbildung 3.6A bzw. 3.7A) dargestellt. Dabei wurde NP_o für alle in den Messungen in Abbildung 3.6A und 3.7A ermittelten Offen-Levels in einem Histogramm der Offenwahrscheinlichkeit gegen die Zeit aufgetragen. Hierin sieht man noch deutlicher die Reduktion von NP_o nach Gabe von U73343 (Abbildung 3.6B). Das gleiche Ergebnis erhält man für U73122 (Abbildung 3.7B). Das Inset in Abbildung 3.6B zeigt ein Histogramm, das die deutlich signifikante Reduktion von NP_o durch U73122 und U73343 aus mehreren Messungen zusammenfasst. Im Vergleich zu den Kontrollperioden reduzierten die Substanzen NP_o von $0,22 \pm 0,04$ (Kontrolle, $n = 20$) auf $0,05 \pm 0,01$ (U 73122, $n = 13$) bzw. $0,04 \pm 0,01$ (U 73343, $n = 7$).

Im Gegensatz dazu wurde die Strom-Amplitude der Einzelkanal-Öffnungen (2,55 pA) von beiden Substanzen nicht verändert.

Um eine Veränderung der Zeitkonstanten des Kanalschaltens durch U73122 oder U73343 zu erkennen, wurden als nächstes Dwell-Time-Histogramme für die Geschlossen-Ereignisse (Abbildung 3.6C, 3.7C) und die Ereignisse vom Offen-Level1 (Abbildung 3.6D, 3.7D) erstellt. Die Kontrollperioden in Abbildung 3.6C+D wurden in zwei Teile (control1 und control2, jeweils 150 s) aufgeteilt. Beide Kurven zeigen jeweils nur geringe Abweichungen voneinander und damit stabile Aufnahme-Bedingungen. Unter U73343 wurden wiederum 150 s ausgewertet. Für U73122 wurden die Dwell-Time-Histogramme jeweils für Zeitabschnitte von 60 s erstellt (Abbildung 3.7C+D). Anschließend wurden die Dwell-Time-Histogramme „angefittet“, wobei sich

für das Histogramm der Geschlossen-Ereignisse jeweils vier Zeitkonstanten und für das der Offen-Ereignisse (Offen-Level1) zwei Zeitkonstanten ergeben (Abbildung 3.6C+D, 3.7C+D). Die Abbildungen 4.8E und 4.8F fassen die Zeitkonstanten aus Abbildung 3.6C+D bzw. 3.7C+D zusammen. Zur besseren Darstellung wurde die y-Achse logarithmiert.

Durch U73343 erhielt man eine deutliche Reduzierung aller Schaltereignisse. Für das Geschlossen-Level erhielt man unter Kontroll-Bedingungen vier Zeitkonstanten, die durch U73343 (Abbildung 3.7E) und U73122 (Abbildung 3.7F) alle erhöht wurden, wobei sich die längeren besonders stark veränderten. Bei den Offen-Dwell-Times wurde durch U73343 besonders das kürzere reduziert, während das längere in etwa gleich blieb. Durch U73122 blieben beide Offen-Dwell-Times im Wesentlichen gleich. Es scheint, als ob U73122 den Kanal nur abschaltet. Die Änderung von τ_1 könnte man als Ausreißer betrachten, oder evtl. als Fit-Problem.

Aufgrund der Excised-Patch-Konfiguration wurden alle löslichen intrazellulären Komponenten durch die interne Lösung ersetzt. Das spricht dagegen, dass zytoplasmatische Komponenten für die blockierenden Wirkungen von U73122 und U73343 nötig sind.

3.2.4 Fehlende Wirkung von U73122 und U73343 auf ROMK (Kir1.1)

Für U73122 und U73343 konnte bisher gezeigt werden, dass sie den GIRK-Kanal unabhängig von der PLC blockieren. Daher könnte man sich eine Interaktion der Substanzen mit der Pore vorstellen. Aus diesem Grund wurde der ROMK (Kir1.1) untersucht. Der Kanal ist genauso wie der Kir2.1 (siehe Abschnitte 1.2.2, 3.2.5) relativ eng mit dem Kir3.1/3.2 verwandt und weist starke Homologien in der Aminosäuren-Sequenz, besonders im Bereich von M1, M2 und der Poren-Region auf (siehe Abschnitt 4.4; Stanfield et al., 2002).

Kir1-Kanäle sind weit verbreitet in der Niere, wo sie eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der K^+ -Sekretion spielen (siehe Review von Hebert et al., 2005). Sie bilden in vivo nur Homotetramere und sind schwach einwärts-gleichrichtend. Durch die hohe PIP_2 -Affinität sind die Kanäle konstitutiv aktiv und haben eine Offenwahrscheinlichkeit von > 90%.

ROMK werden reguliert von pH (Schulze et al., 2003), zytoplasmatischem ATP (Wang & Giebisch, 1991) und Kinasen wie PKA (Liou et al., 1999), PKC (Zeng et al., 2003a) und Tyrosinkinase. Durch PKA-Phosphorylierung kann die Interaktion mit PIP_2 verstärkt werden (Liou et al., 1999; Zeng et al., 2003a). Im Gegensatz dazu hemmt die PKC die Kanalaktivität, indem sie die Membran- PIP_2 -Level über einen noch unbekanntes Mechanismus reduziert (Zeng et al., 2003a).

Mutationen, die die PIP₂-Sensitivität verändern, verursachen das Bartter-Syndrom (Lopes et al., 2002). Das Bartter-Syndrom (Typ 2) ist ein autosomal-rezessiv vererbtes Salzverlustsyndrom, das mit den Symptomen Hypokaliämie, metabolische Alkalose, Hypotonie und Polyurie einhergeht. Durch eine erniedrigte PIP₂-Interaktion wird die Offenwahrscheinlichkeit des ROMK im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife stark erniedrigt. Dadurch sind die K⁺-Konzentrationen im renalen Lumen zu niedrig, um die Aktivität des Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Transporters aufrechtzuerhalten (Asteria, 1997). Dies führt zu Na⁺-Verlusten und einem hyperreninämischen Hyperaldosteronismus (Classen et al., 2004).

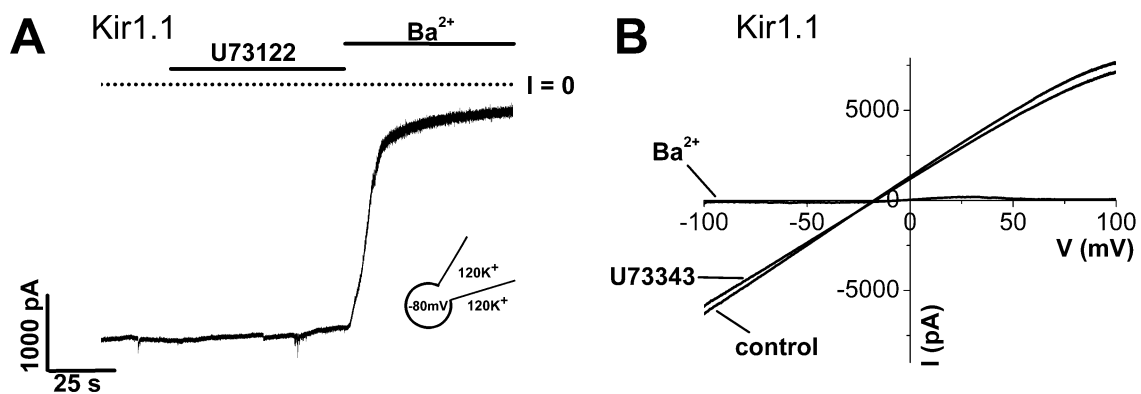


Abbildung 3.8. Wirkung von U73122 und U73343 auf ROMK- (Kir1.1) Kanäle.

Die Whole-Cell-Messungen wurden an HEK293-Zellen, die stabil mit Kir1.1 transfiziert sind, durchgeführt.

(A) Diese Aufnahme zeigt eine Messung bei konstantem Haltepotential von -80 mV. 10 μM U73122 wurde in die Badlösung appliziert und anschließend als Kontrolle 2 mM Ba²⁺ (n = 9).

(B) Es wurden Spannungsrampen von -100 bis +100 mV (100 mV/s) erzeugt. Die Ströme wurden vor und nach Applikation von 10 μM U73343 aufgenommen (n = 4). Als Kontrolle wurde 2 mM Ba²⁺ appliziert.

Die Abbildung 3.8 zeigt typische ROMK- (Kir1.1) Ströme in Whole-Cell-Messungen an einer HEK293-Zelllinie, die stabil mit dem Kir1.1 transfiziert war. Bei hohen extrazellulären K⁺-Konzentrationen ($E_K = 0$ mV) und einem Haltepotential von -80 mV war der ROMK konstitutiv aktiv und zeigte einen starken Einwärtsstrom. Dieser Strom ließ sich weder mit 10 μM U73122 (Abbildung 3.8A) noch mit 10 μM U73343 reduzieren.

Bei einem Rampen-Protokoll (Abbildung 3.8B) sieht man, warum der ROMK im Gegensatz zum IRK oder GIRK nur als schwach gleichrichtend bezeichnet wird (Nichols et al., 1994). Die Strom-Spannungs-Beziehung ist fast linear mit einer nur ganz leichten Einwärtsgleichrichtung. Genau wie beim konstanten Haltepotential hatte die Gabe von 10 μM U73343 keine Wirkung auf die ROMK-Ströme über den gesamten Spannungsbereich (Abbildung 3.8B).

3.2.5 Fehlende Wirkung von U73122 und U73343 auf den IRK (Kir2.1)

Obwohl U73122 und U73343 keine Wirkung auf den ROMK zeigten (siehe Abschnitt 3.2.4), könnte man sich trotzdem noch eine Interaktion mit der Porenregion oder im Bereich von M1 / M2 vorstellen. Deshalb wurde der IRK (Kir2.1) - ein weiterer Kanal aus der Kir-Familie - der sehr eng mit dem GIRK verwandt ist, transient in HEK-Zellen exprimiert (siehe Abschnitt 1.2.2).

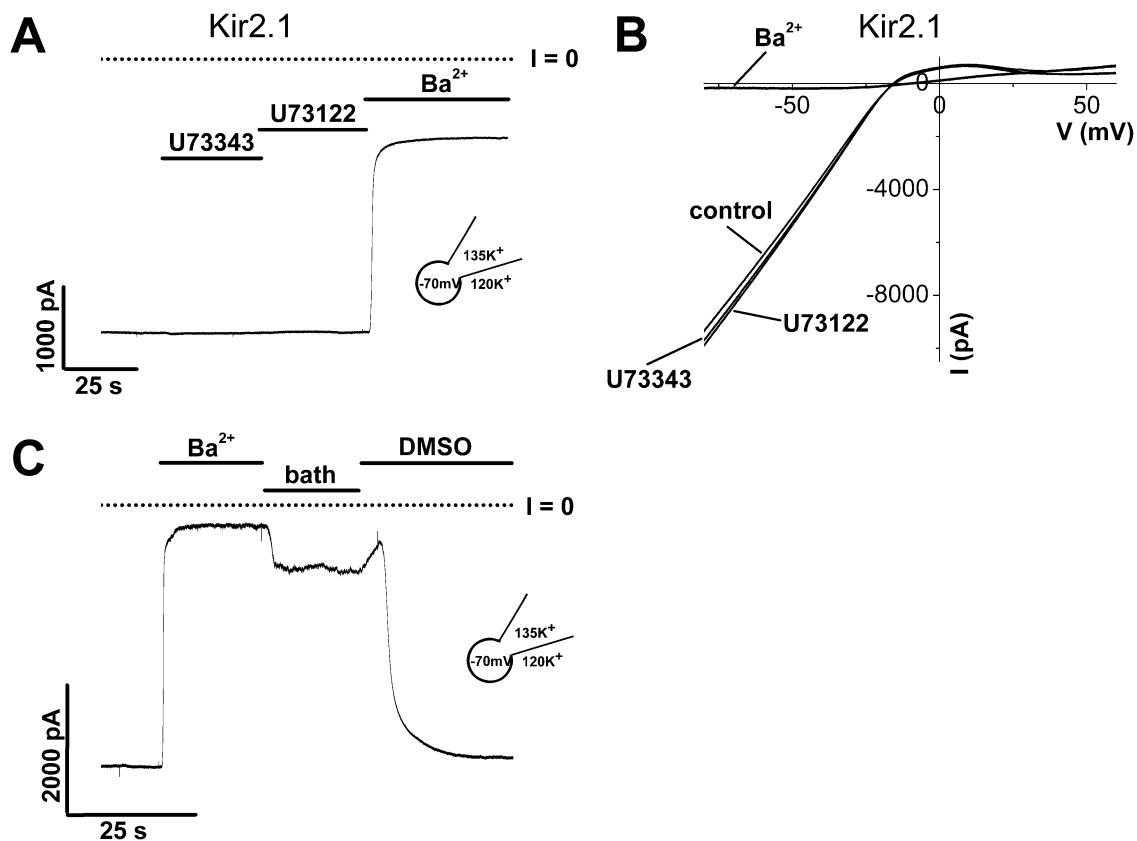


Abbildung 3.9. Wirkung von U73122 und U73343 auf IRK- (Kir2.1) Kanäle.

Die Whole-Cell-Messungen wurden an HEK293-Zellen, die transient mit Kir2.1 transfiziert waren, durchgeführt.

(A) Diese Aufnahme zeigt eine Messung bei konstantem Haltepotential von -70 mV. 10 μM U73343, 10 μM U73122 und als Kontrolle 2 mM Ba²⁺ wurden in die Badlösung appliziert (U73122: n = 7; U73343: n = 14).

(B) Es wurden Spannungsrampen von -80 bis +60 mV (80 mV/s) erzeugt. Die Ströme wurden vor und nach Applikation von 10 μM U73122 und 10 μM U73343 aufgenommen. Als Kontrolle wurde 2 mM Ba²⁺ appliziert (n = 6).

(C) Diese Aufnahme wurde bei konstantem Haltepotential von -70 mV durchgeführt. Es wurde 2 mM Ba²⁺ appliziert und anschließend Auswaschversuche mit Badlösung und mit 0,2%iger DMSO-Lösung durchgeführt (n = 4).

Whole-Cell-Messungen an IRK-Kanälen bei fast symmetrischen K⁺-Konzentrationen ($E_K = -3$ mV) und einem konstanten Haltepotential von -70 mV zeigten einen starken

Einwärtsstrom (Abbildung 3.9A). Genau wie der ROMK ist der IRK bei negativen Haltepotentialen konstitutiv aktiv. In Rampen-Protokollen zeigte er - im Gegensatz zum ROMK (Abbildung 3.8B) - die gleiche starke Einwärtsgleichrichtung (Abbildung 3.9B) wie der GIRK (Abbildung 3.5B). Aber genau wie bei den ROMK bewirkten weder 10 μM U73122 noch 10 μM U73343 eine Stromreduktion der IRK-Kanäle - weder bei Applikation über einige Minuten (Abbildung 3.9A) noch bei spannungsabhängiger Gabe in Rampenprotokollen (Abbildung 3.9B).

Überraschenderweise erwiesen sich U73122 und U73343 als sehr selektive Hemmer, die zwischen den einzelnen Mitgliedern der Kir-Familie unterscheiden können.

Im Laufe der Untersuchungen stellte sich die Frage, ob DMSO als Lösungsmittel von U73122 und U73343 eine signifikante Wirkung auf die untersuchten K^+ -Kanäle haben kann. In Kontrolluntersuchungen am GIRK ($n = 7$) und MaxiK ($n = 5$) zeigte DMSO keine stromreduzierende Wirkung auf die Kanäle (nicht illustriert), so dass es als Lösungsmittel verwendet werden konnte.

Allerdings fand sich bei den DMSO-Versuchen ein interessanter Nebenbefund. In Abbildung 3.9C ist eine entsprechende Whole-Cell-Messung an IRK-Kanälen bei einem konstanten Haltepotential von -70 mV dargestellt. Zur Blockierung des Stroms wurden 2 mM Ba^{2+} appliziert. Anschließend wurden Auswaschversuche durchgeführt, zuerst mit normaler Badlösung, die nur einen geringen Anteil des Ba^{2+} auswäscht. Danach wurde eine 0,2%ige DMSO-Lösung (DMSO als Lösungsmittel für U73122 / U73343: 0,1%ig) gegeben, die den Strom fast vollständig wiederherstellte. Es liegt nahe, dass die bekannten „Schleuser“-Eigenschaften von DMSO an Membranen für den verbesserten und beschleunigten Ba^{2+} -Auswasch verantwortlich sind. Diese Hypothese wurde aber im Rahmen meiner Dissertation nicht weiter verfolgt.

3.2.6 Fehlende Wirkung von U73122 und U73343 auf KCNQ-Kanäle

Diese Experimente sollten eine Wirkung von U73122 auf die KCNQ-Familie testen. Die Untersuchungen sind wichtig, weil PIP_2 eine große Rolle in der Regulation der Offen-Wahrscheinlichkeit der KCNQ-Kanäle spielt (Suh & Hille, 2005). Außerdem hat die PIP_2 -Regulation bei den KCNQ große Ähnlichkeit mit der Regulation bei den GIRK. Wie bei den GIRK soll PIP_2 den Offen-Zustand des KCNQ1 stabilisieren, indem es an eine Stelle bindet, die starke Homologien zur identifizierten PIP_2 -Bindungsstelle des Kir 6.2 - einem Kanal aus der Kir-Familie - aufweist (Loussouarn et al., 2003).

Außerdem werden die KCNQ genau wie die GIRK durch Rezeptoren gehemmt, die an $G_{q/11}$ koppeln, wodurch die PLC β aktiviert wird und so zum Abbau von PIP₂ führt (Brown & Yu, 2000; Selyanko et al., 2000; Zhang et al., 2003; Loussouarn et al., 2003; Suh et al., 2004; Delmas & Brown, 2005). Auf diese Weise kann der KCNQ-Strom moduliert werden, indem die PLC die PIP₂-Konzentration, die vom Kanal benötigt wird, an der Membran verringert (Zhang et al., 2003; Horowitz et al., 2005; Suh et al., 2006).

Die KCNQ-Kanäle (K_v7) sind spannungsabhängige auswärts-gleichrichtende K^+ -Kanäle. Sie sind langsam aktivierbar, öffnen bei Depolarisation und sind so wichtig für die Repolarisation und Modulierung der Erregbarkeit von elektrisch aktiven Zellen wie Herzzellen oder Neuronen (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996). Die KCNQ-Kanäle haben den typischen Aufbau der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle mit 6TM-Segmenten S1-S6, einem P-Loop, der TM5 und TM6 miteinander verbindet und die Kanalpore mit Selektivitätsfilter bildet und einem S4-Segment, das einen hohen Anteil an positiv geladenen Aminosäuren enthält, die für den intrinsischen Spannungssensor verantwortlich sind (Hille, 2001). Bisher sind fünf Mitglieder der KCNQ-Familie bekannt (KCNQ1-5), die im Körper weit verbreitet sind.

KCNQ1-Experimente

Zunächst wurde der KCNQ1 mit der β -Untereinheit E1 (minK) transient in HEK-Zellen exprimiert (Abbildung 3.10A+B).

Der KCNQ1 ist v. a. im Herz stark exprimiert, kommt aber auch in Pankreas, Niere, Gastrointestinaltrakt und Innenohr vor (Gutman et al., 2005). Der KCNQ1 ist der einzige Kanal dieser Familie, der nur Homotetramere bildet (Jentsch, 2000). Alleine produziert der KCNQ1 nur einen sehr kleinen Auswärtsstrom. Allerdings können alle KCNQ- α -Untereinheiten durch Assoziation mit transmembranalen β -Untereinheiten aus der KCNE-Familie moduliert werden. Werden KCNQ1 und KCNE1 (auch „minK = minimal K^+ -channel protein“ genannt) co-exprimiert, erhält man einen deutlich größeren Strom, eine verlangsamte Aktivierungskinetik und eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit (Hille, 2001). KCNQ1 und KCNE1 sind so am Herzen für den langsam aktivierbaren, verzögert gleichrichtenden I_{KS} -Strom verantwortlich, der die Repolarisation des Aktionspotentials vermittelt.

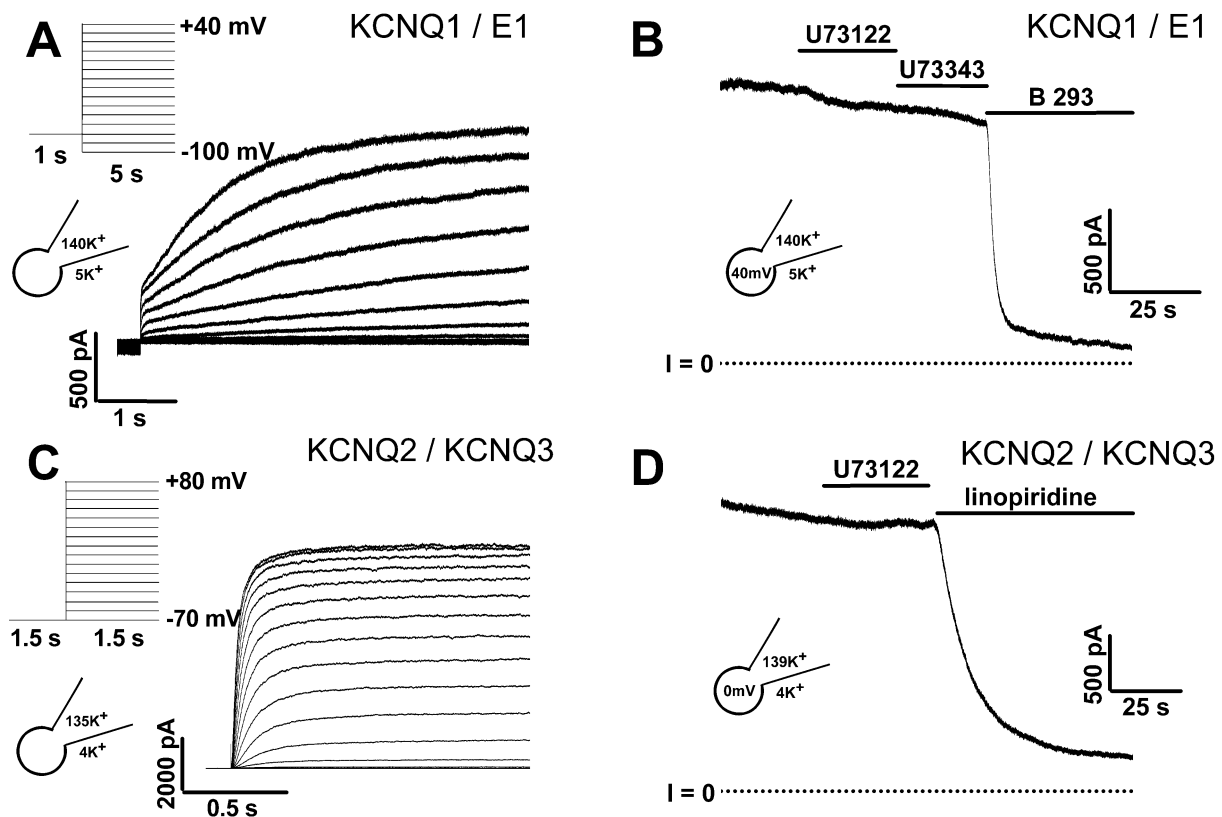


Abbildung 3.10. Wirkung von U73122 und U73343 auf KCNQ-Kanäle.

Die Whole-Cell-Messungen wurden an HEK293-Zellen, die transient mit KCNQ1/E1 (A+B) bzw. mit KCNQ2 / KCNQ3 (C+D) transfiziert waren, durchgeführt.

(A) Es wurden Spannungstrepfen von -100 auf +40 mV an HEK-Zellen erzeugt, die mit KCNQ1 und der β -Untereinheit E1 (minK) transfiziert waren. Die Ströme wurden vor Applikation von 10 μ M U73122 aufgenommen.

(B) Diese Aufnahme zeigt eine typische Messung von HEK-Zellen, die mit KCNQ1 und der β -Untereinheit E1 transfiziert waren. Die Zellen wurden bei einem konstanten Haltepotential von 40 mV gehalten. Es wurden 10 μ M U73122, 10 μ M U73343 und als Kontrolle 100 μ M B293, ein spezifischer KCNQ1-Blocker, in die Badlösung appliziert (n = 8).

(C) Es wurden Spannungstrepfen von -70 auf +80 mV an HEK-Zellen erzeugt, die mit KCNQ2 und KCNQ3 transfiziert waren. Die Ströme wurden vor Applikation von 10 μ M U73122 aufgenommen. (Diese Messung wurde mir freundlicherweise von Herrn M. Nissen zur Verfügung gestellt.)

(D) Diese Aufnahme zeigt eine typische Messung von HEK-Zellen, die mit KCNQ2 und KCNQ3 transfiziert waren. Die Zellen wurden bei einem konstanten Haltepotential von 0 mV gehalten. Nach Erreichen eines Steady-States wurden 10 μ M U73122 und als Kontrolle 10 μ M Linopiridin, ein spezifischer KCNQ2 / KCNQ3-Blocker, in die Badlösung appliziert (n = 5).

In Whole-Cell-Messungen mit Treppenprotokollen (Abbildung 3.10A) zeigte der KCNQ1 / KCNE1 einen typischen starken auswärts-gleichrichtenden Strom, d.h. zu einem deutlichen Anstieg des Stroms kommt es erst bei Depolarisation ab einer Spannung von etwa -30 mV (Umkehrpotential = -88 mV). Charakteristisch für den KCNQ1 / KCNE1 ist auch die langsame Aktivierbarkeit. So ist das Strommaximum noch 5 s nach einem Spannungssprung nicht vollständig erreicht.

Um die mögliche Wirkung von U73122 auf den KCNQ1 zu untersuchen, habe ich ein konstantes Haltepotential verwendet. Die Abbildung 3.10B zeigt eine Whole-Cell-Messung bei einem konstanten Haltepotential von +40 mV. Bei dieser Spannung zeigte der KCNQ1

zum Teil einen sehr starken Auswärtsstrom mit einer leichten kontinuierlichen Stromabnahme („Rundown“). Die Gabe von 10 μM U73122 oder U73343 zeigte unter den in dieser Arbeit verwendeten Messbedingungen keinen signifikanten blockierenden Effekt.

Als Kontrolle wurde 100 μM B293 (wurde mir freundlicherweise von Sanofi-Aventis, Frankfurt, zur Verfügung gestellt) als spezifischer Blocker verwendet, das den Strom fast komplett blockierte.

KCNQ2- / KCNQ3- Experimente

Als nächstes wurde der KCNQ2, co-exprimiert mit dem KCNQ3 in HEK-Zellen auf eine Wirkung von U73122 untersucht.

Die KCNQ2- und KCNQ3-Kanäle kommen fast ausschließlich im zentralen Nervengewebe vor, und zwar v. a. im Hippocampus und im Cortex (Schroeder et al., 1998; Gutman et al., 2005). Im Gegensatz zum KCNQ1 können beide Kanäle sowohl Homotetramere (in Oozyten; Wang et al., 1998) als auch Heterotetramere untereinander bilden (Wang et al., 1998; Schroeder et al., 1998). Diese Heterotetramere zeigen im Vergleich einen deutlichen Anstieg der Stromamplitude mit etwas veränderter Kinetik und veränderten pharmakologischen Eigenschaften (Wang et al., 1998; Schroeder et al., 1998).

In Neuronen sind die KCNQ2- / KCNQ3- Kanäle am sogenannten „M-Strom“ beteiligt (Wang et al., 1998; Schroeder et al., 2000). Dies ist ein langsam aktivierender Auswärtsstrom, der schon bei leichter Depolarisation auftritt und der über den ACh-Rezeptor (M = muskarinerg) gehemmt wird (Brown et al., 1989; Marrion, 1997). Dadurch kann die neuronale Erregbarkeit reguliert werden.

In Treppenprotokollen (Abbildung 3.10C) zeigte der KCNQ2 / KCNQ3 im Gegensatz zum KCNQ1 schon bei leichter Depolarisation einen sehr starken Auswärtsstrom (Umkehrpotential = -93 mV). Obwohl auch der KCNQ2 / KCNQ3 zu den eher langsam aktivierbaren Kanälen gezählt wird, aktivierte er in Spannungstreppen deutlich schneller als der KCNQ1 (Abbildung 3.10C).

Die Abbildung 3.10D zeigt eine typische Whole-Cell-Messung bei einem konstanten Haltepotential von 0 mV. Da der KCNQ2 / KCNQ3 bereits bei leichter Depolarisation aktiviert wurde, sieht man schon bei 0 mV einen im Vergleich zum KCNQ1 ausreichend starken Auswärtsstrom mit einem leichten Rundown. Die Gabe von 10 μM U73122 zeigte wiederum keinen signifikanten blockierenden Effekt. Als Kontrolle wurde ein spezifischer Blocker - 10 μM Linopiridin - verwendet, der den Strom fast komplett blockierte.

Diese Ergebnisse passen auf den ersten Blick nicht zu den Befunden von Horowitz et al. (2005), die durch U73122 zunächst eine schnelle Stromzunahme und anschließend eine stetige Stromabnahme gesehen haben. Allerdings werden in meiner Arbeit Wirkungen im Zeitbereich von Sekunden untersucht, während es bei Horowitz über 5 min dauert, um den Strom der KCNQ um etwa 50% zu hemmen. Diese Wirkung und die langen Zeitkonstanten lassen sich wahrscheinlich über die Wirkung von U73122 auf die PLC erklären, und zwar soll es zuerst über eine PLC-Hemmung und dann über eine PLC-Aktivierung wirken (Horowitz et al., 2005).

3.2.7 Fehlende Wirkung von U73122 und U73343 auf den IK1-Kanal

Im nächsten Abschnitt wird gezeigt, dass der Ca^{2+} -abhängige MaxiK-Kanal von U73122 und U73343 geblockt wird. Um die Selektivität dieses Blocks innerhalb der Familie der Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle zu bestimmen, habe ich einen Kanal untersucht, der zu einer anderen Klasse von Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen gehört, nämlich den IK1 (SK4). Dazu wurde der hIK1 transient in HEK-Zellen exprimiert.

Der IK (intermediate conductance K^+ channel) wird so wegen seiner Einzelkanalleitfähigkeit von etwa 20 - 80 pS genannt, die zwischen dem SK (= „small“ K^+) mit 4 - 20 pS und dem MaxiK oder BK (= „big“ K^+) mit 100 - 250 pS liegt.

Anders als der SK und der MaxiK wird der IK nur in nicht-erregbaren Zellen exprimiert (Ishii et al., 1997), besonders in Zellen des hämatopoietischen Systems und in Endothelzellen von Organen, die in Salz- und Flüssigkeitstransport involviert sind wie Colon, Lunge, Speicheldrüsen (Ishii et al., 1997; Warth et al., 1999). Außerdem kommt er in den glatten Muskelzellen von Gefäßen und Fibroblasten vor, während er in Hirn oder Herz nicht exprimiert wird (Ashcroft, 2000).

Im Gegensatz zum MaxiK sind die IK nur sehr schwach spannungsabhängig (Vergara et al., 1998; Nehrke et al., 2003), da sie in der 4. Transmembran-Domäne - dem Spannungssensor - nur sehr wenige positiv geladene Aminosäuren besitzen. Sie sind allerdings sehr stark Ca^{2+} -sensitiv und können bereits durch geringe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen (freies Ca^{2+} über 50 - 100nM) aktiviert werden (Ashcroft, 2000). Dadurch spielen die IK-Kanäle eine wichtige Rolle bei der Ca^{2+} -abhängigen Signaltransduktion. Sie besitzen keine Struktur, die der Ca^{2+} -Bowl des MaxiK verwandt ist. Stattdessen ist Calmodulin konstitutiv an eine C-terminale Region der IK gebunden - auch in Abwesenheit von Ca^{2+} (Fanger et al., 1999). Durch die Bindung von Ca^{2+} an dieses Calmodulin wird der Kanal aktiviert (Jensen et al., 1998; Schumacher et al., 2001).

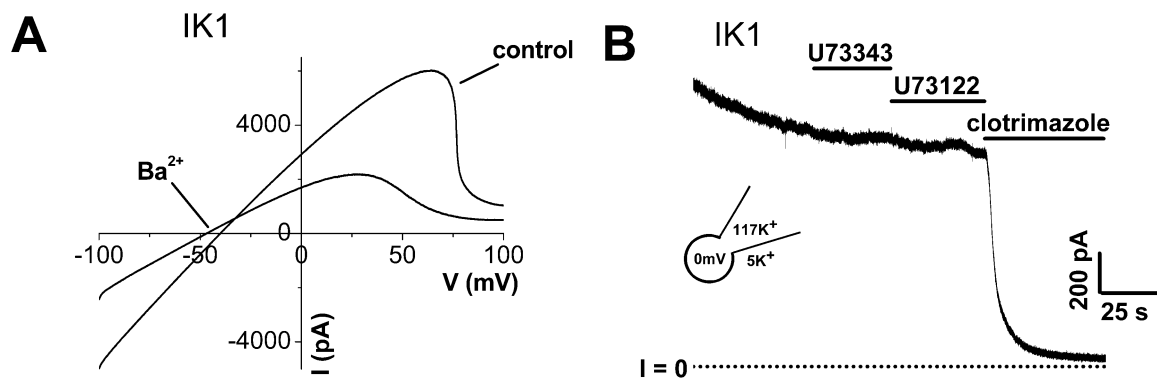


Abbildung 3.11. Wirkung von U73122 und U73343 auf IK1-Kanäle.

Die Whole-Cell-Messungen wurden an HEK293-Zellen, die mit hIK1 transfiziert waren, durchgeführt.

(A) Es wurden Spannungsrampen von -100 bis +100 mV (100 mV/s) erzeugt. Die Ströme werden vor und nach Applikation von 2 mM Ba^{2+} gezeigt.

(B) Diese Aufnahme zeigt eine typische Messung bei einem konstanten Haltepotential von 0 mV. Es wurden 10 μM U73343, 10 μM U73122 und als Kontrolle der IK-Blocker Clotrimazole (1 μM) in die Badlösung appliziert (n = 6).

Die Abbildung 3.11A zeigt eine typische Whole-Cell-Messung von IK-Kanälen mit einem Rampen-Protokoll. Man sieht deutlich an der I-V-Kurve, dass der Strom über weite Spannungsbereiche fast linear verläuft, weil die Kanäle kaum spannungsabhängig sind. Erst bei hohen (unphysiologischen) Potentialen kommt es zu einem Abknicken der Kurve (Jensen et al., 2001). Im Gegensatz zu den Kir-Kanälen (siehe Abschnitte 3.2.2, 3.2.4, 3.2.5) reduzierte 2 mM Ba^{2+} den IK-Strom deutlich schwächer (um etwa 50%; Abbildung 3.11A). Als Kontrolle wurde daher das Antimykotikum Clotrimazole, das sich als potenter und relativ selektiver Blocker der IK-Kanäle herausgestellt hat, verwendet (Alvarez et al., 1992).

Da die IK-Kanäle kaum Spannungsabhängigkeit zeigen, können sie bei einem konstanten Haltepotential auf eine Wirkung von U73122 und U73343 untersucht werden. Die Abbildung 3.11B zeigt eine Whole-Cell-Messung bei einem Haltepotential von 0 mV. Typisch ist der Auswärtsstrom mit einem leichten Rundown. Nachdem der Strom über einige Zeit etwa konstant geblieben ist, wurden die Substanzen gegeben. Sowohl 10 μM U73343 als auch 10 μM U73122 hatten keine Wirkung auf die Ströme.

Da U73122 und U73343 keine Wirkung auf die IK-Ströme zeigten, wurden die nahe verwandten SK-Kanäle nicht zusätzlich getestet.

3.2.8 Wirkung von U73122 und U73343 auf den MaxiK

Zusätzlich zur Hemmung von GIRK-Kanälen stellten sich überraschenderweise U73122 und U73343 als potente Blocker der MaxiK-(BK) Kanäle (siehe Abschnitt 2.2.4) heraus.

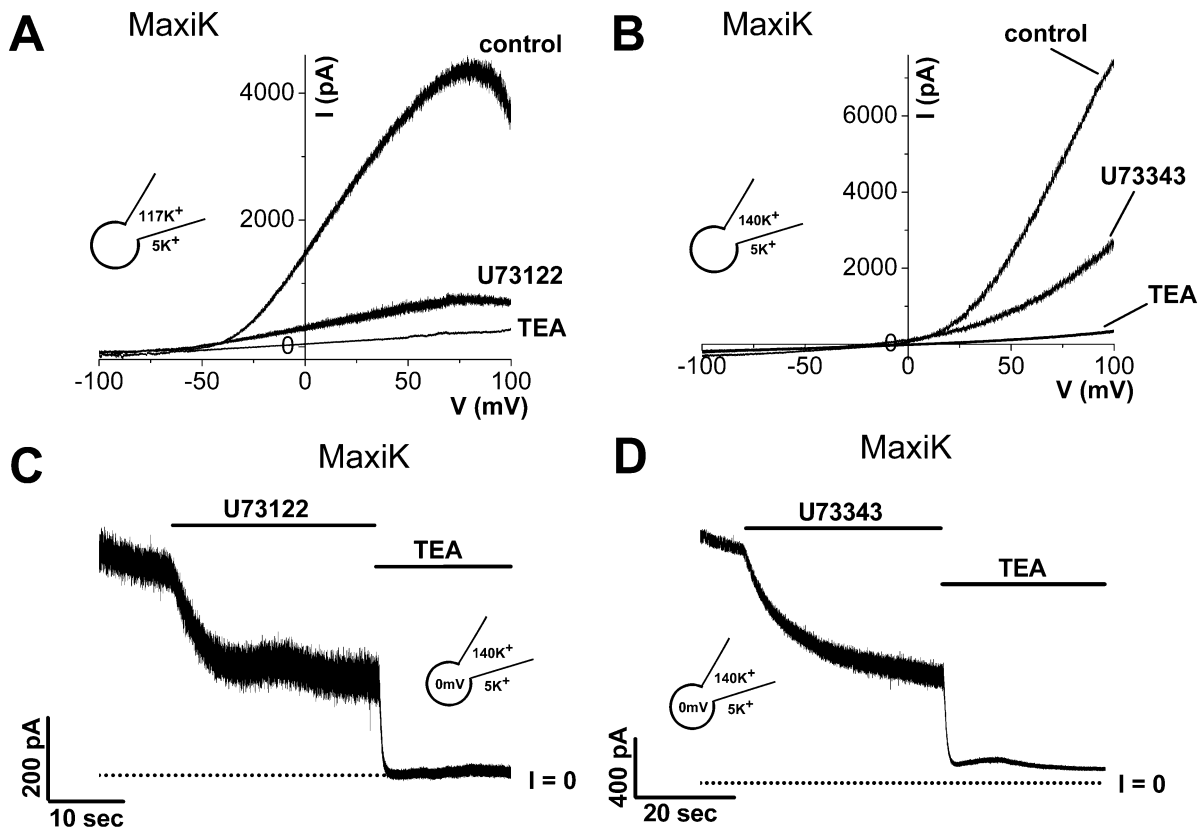


Abbildung 3.12. Wirkung von U73122 und U73343 auf MaxiK (BK)-Kanäle.

Die Whole-Cell-Messungen wurden an HEK293-Zellen, die stabil mit der MaxiK α und β 1-Untereinheit transfiziert waren, durchgeführt.

(A), (B) Es wurden Spannungsrampen von -100 bis +70 mV bzw. +100 mV erzeugt (20 mV/s). Die Ströme wurden vor und nach Applikation von 10 μ M U73122 (A) bzw. 10 μ M U73343 (B) aufgenommen. Als Kontrolle wurde jeweils 10 mM TEA appliziert.

(C), (D) Diese Aufnahmen zeigen Messungen bei konstantem Haltepotential von 0 mV. 10 μ M U73122 (C) bzw. 10 μ M U73343 (D) wurden über das Filament in die Badlösung appliziert und anschließend als Kontrolle jeweils 10 mM TEA.

Die Abbildung 3.12 zeigt Whole-Cell-Messungen an einer HEK293-Zelllinie, die stabil mit der MaxiK α - und β 1-Untereinheit transfiziert war.

In Abbildung 3.12A+B sieht man typische Messungen mit Spannungsrampen. Dabei wurden die MaxiK-Ströme typischerweise zwischen -30 and +30 mV aktiviert (Zhang et al., 2006) und zeigten einen stark auswärts-gerichteten Strom. Je früher die MaxiK aktivierten, umso eher konnte man ein Abknicken der Kurven bei hohen (unphysiologischen) Potentialen beobachten (Abbildung 3.12A), also eine Stromabnahme trotz einer höheren

treibenden Kraft für K^+ . Aktivierten die Kanäle jedoch spät, dann stieg der Strom mindestens bis zu Potentialen von 100 mV weiter stark an (Abbildung 3.12B). Nach Zhang et al. (2006) soll der Punkt der Aktivierung und die Form der Rampen abhängig sein vom Zeitpunkt der Messung. Nach Aktivierung durch Depolarisation bzw. Patch-Exzision kommt es zu einem Rundown, d.h. der Strom nimmt ab. Dies entsteht laut Zhang et al. (2006) durch zwei Mechanismen: Zum einen nimmt die Zahl der funktionell aktiven Kanäle ab, wodurch die maximale Leitfähigkeit abnimmt. Zum anderen verschiebt sich die Spannungsabhängigkeit der verbleibenden Kanäle um ca. 30 mV in positive Richtung, wodurch die Offenwahrscheinlichkeit bei einem vorgegebenen Potential abnimmt. Dies soll v.a. durch eine Oxidation von Cystein-Resten geschehen.

Nach Applikation von 10 μ M U73122 (Abbildung 3.12A) bzw. 10 μ M U73343 (Abbildung 3.12B) nahm der Strom deutlich ab. Anschließend wurde als Kontrolle 10 mM TEA (Tetraethylammonium-Chlorid) - ein unspezifischer K^+ -Kanal-Blocker - appliziert, der die restlichen MaxiK-Ströme fast vollständig blockierte.

Die Abbildungen 3.12C+D zeigen typische Whole-Cell-Messungen bei einem konstanten Haltepotential von 0 mV (mit gesättigter Ca^{2+} -Konzentration in der internen Lösung). In beiden Messungen sieht man deutlich den oben erwähnten Rundown, der typisch für den MaxiK ist. Sobald der Strom annähernd konstant war, wurden 10 μ M U73122 (Abbildung 3.12C) bzw. 10 μ M U73343 (Abbildung 3.12D) appliziert, wodurch der Auswärtsstrom rasch deutlich abnahm.

Der Zeitverlauf, mit dem die beiden Substanzen den MaxiK blockierten, ist dem Zeitverlauf der GIRK-Hemmung sehr ähnlich. Die Zeitkonstanten für die MaxiK-Hemmung betragen $2,8 \pm 0,4$ s ($n = 5$) für U73122 und $4,2 \pm 0,9$ s ($n = 4$) für U73343. Im Vergleich dazu waren die Zeitkonstanten für die Hemmung des GIRK-Stroms $4,1 \pm 0,5$ s ($n = 7$) bzw. $3,7 \pm 0,5$ s ($n = 7$). Der Lösungsaustausch durch das Filament lag dabei im Bereich von 1 s, die Anflutung bei < 300 ms (gemessen mit 10 mM TEA bei 50% der maximalen Wirkung).

3.2.9 Wirkungen von Ba^{2+} , Tertiapin und NEM auf den MaxiK

Nachdem gezeigt werden konnte, dass U73122 und U73343 den MaxiK blockieren, wurde als nächstes überprüft, ob die β_1 -Untereinheit (siehe Abschnitt 1.2.4) für die Wirkung der beiden Substanzen notwendig ist.

Die Abbildung 3.13A zeigt eine Whole-Cell-Messung an HEK293-Zellen, die dieses Mal transient nur mit der MaxiK α -Untereinheit transfiziert wurden. Unter den hier verwendeten Messbedingungen führte das Fehlen der β_1 -Untereinheit zu keinen auffälligen

Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften. Die Messungen wurden wiederum bei einem Haltepotential von 0 mV durchgeführt. Nach Gabe von 10 μM U73122 nahm der Strom schnell und deutlich ab, genauso wie bei den Messungen mit der α / β_1 -Untereinheit (Abbildung 3.12C). Eine kleine übrig bleibende Strom-Komponente konnte mit 10 mM TEA geblockt werden. Dieses Experiment und die entsprechenden statistischen Auswertungen (Daten nicht gezeigt) zeigen, daß die β_1 -Untereinheit, die in Abbildung 3.12 vorhanden war, nicht für die blockierende Wirkung von U73122 und U73343 benötigt wurde. Da in der Antwort der Substanzen die An- oder Abwesenheit der β -Untereinheit keinen Unterschied machte, wurden die Daten der beiden Messgruppen für weitere statistische Auswertungen zusammengelegt.

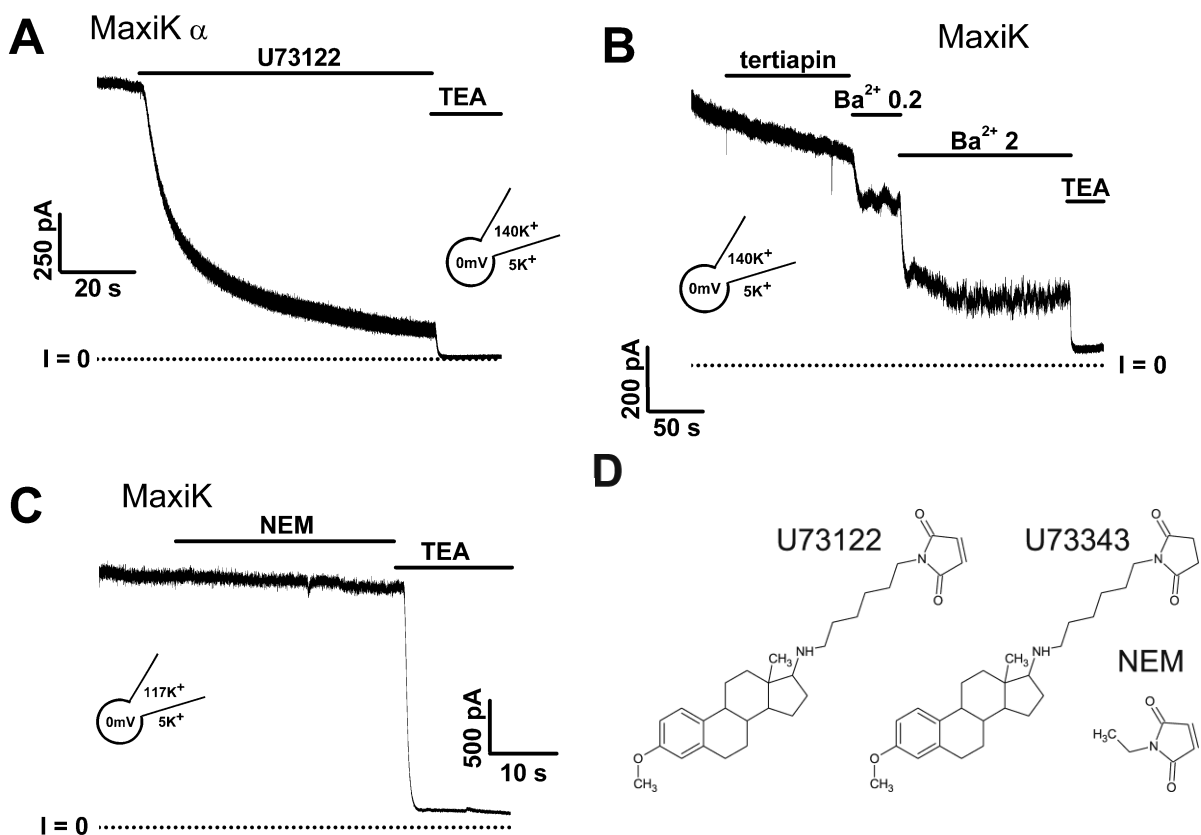


Abbildung 3.13. Wirkung von U73122, Tertiapin und NEM auf die Ströme der MaxiK α -Untereinheit.

Die Whole-Cell-Messungen wurden an HEK293-Zellen, die transient nur mit der MaxiK α -Untereinheit transfiziert waren, durchgeführt und bei einem konstanten Haltepotential von 0 mV gehalten (gesättigte Ca $^{2+}$ -Konzentrationen in der internen Lösung).

(A) Nach Erreichen eines Steady-States wurden 10 μM U73122 über das Filament in die Badlösung appliziert und anschließend als Kontrolle 10 mM TEA.

(B) Es wurden die K $^+$ -Kanal-Blocker 60 nM Tertiapin, 200 μM Ba $^{2+}$ und 2 mM Ba $^{2+}$ über das Filament appliziert. Als Kontrolle wurden 10 mM TEA gegeben.

(C) Diese Aufnahme zeigt die Applikation von 100 μM NEM. Als Kontrolle wurde wieder 10 mM TEA gegeben (n = 3).

(D) Diese Abbildung zeigt die Strukturformeln von U73122, U73343 und NEM. NEM besitzt dieselbe reaktive Gruppe (Doppelbindung) wie U73122, während U73343 durch das Fehlen dieser Doppelbindung chemisch inaktiv ist.

Die nächste Untersuchung sollte die Wirkung von U73122 mit der Wirkung von verschiedenen K⁺-Kanal-Blockern vergleichen. Interessant ist dabei v. a. Tertiapin, das hinsichtlich der Kir eine ähnliche Spezifität aufweist (siehe Abschnitte 3.2.2, 4.2).

Die Abbildung 3.13B zeigt eine Whole-Cell-Messung bei einem konstanten Haltepotential von 0 mV. Gab man nun Tertiapin in die Badlösung, dann zeigte es keine Wirkung, d.h. es kam es zu keiner Stromreduktion. Dies bedeutet, dass Tertiapin wahrscheinlich anders als U73122 und U73343 wirkt, die unter meinen Messbedingungen den GIRK und den MaxiK in vergleichbarer Weise blockierten (siehe Abschnitt 4.2).

Die Gabe von Ba²⁺ als unspezifischem Blocker der meisten K⁺-Kanäle, führt dagegen zu einer Stromreduktion sowohl in einer Konzentration von 200 µM als auch von 2 mM. Allerdings war der Block von MaxiK längst nicht so stark wie der von Kir-Kanälen. Erst 10 mM TEA hemmten den MaxiK-Strom komplett.

Der einzige strukturelle Unterschied zwischen U73122 (N-substituiertes Maleimid) und U73343 ist eine Doppelbindung (Abbildung 3.13D), die U73122 chemisch reaktiv macht. Wenn man die Strukturen von U73122 und der Cystein-modifizierenden Substanz NEM (N-ethylmaleimid) vergleicht (Abbildung 3.13D), dann erkennt man, dass die beiden Substanzen die gleiche reaktive Gruppe enthalten. Dadurch könnte U73122 möglicherweise wie NEM eine Alkylierung von Cystein-Resten verursachen (siehe Abschnitt 4.3; Horowitz et al., 2005). Im Gegensatz dazu ist U73343 das nicht-reaktive Succinimid-Analogon.

Um solch eine mögliche Alkylierungsreaktion zu testen, wurde als nächstes ein Versuch mit NEM durchgeführt. Die Abbildung 3.13C zeigt ein ähnliches Experiment wie in Abbildung 3.13A, eine Whole-Cell-Messung am MaxiK bei einem konstanten Haltepotential von 0 mV. Dabei sollte die hemmende Wirkung von U73122 mit der von NEM verglichen werden. Es wurden 100 µM NEM - eine U73122 und U73343 vergleichbar hohe Dosis (Zhang & Horrigan, 2005) - appliziert. Da NEM membran-permeabel ist, kann es wie U73122 und U73343 von extrazellulär gegeben werden. Allerdings hatte NEM in dem Zeitrahmen, in dem U73122 und U73343 den MaxiK blockierten, keine Wirkung auf die MaxiK-Ströme.

Dieses Ergebnis macht eine Modifikation des Kanalproteins durch eine unspezifische Alkylierungsreaktion durch U73122 als Block-Mechanismus am MaxiK sehr unwahrscheinlich (siehe Abschnitt 4.3).

3.2.10 Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehungen von U73122, U73343 und Bupivacain am MaxiK

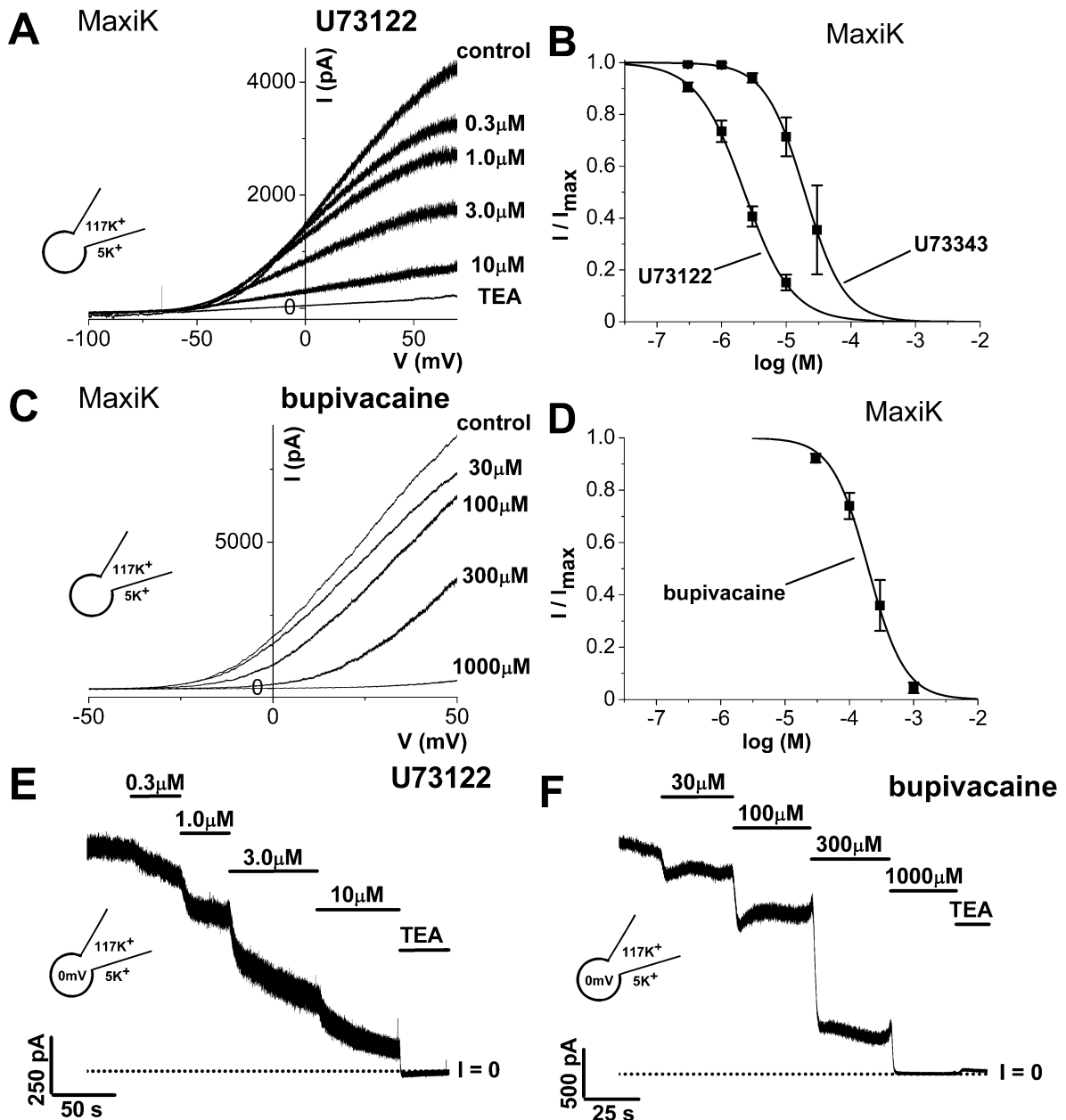


Abbildung 3.14. Dosis-Wirkungsbeziehungen von U73122, U73343 und Bupivacain an MaxiK-(BK) Kanälen.

Die Whole-Cell-Messungen wurden an HEK293-Zellen, die transient mit der MaxiK α -Untereinheit transfiziert waren, durchgeführt.

(A), (C) Es wurden Spannungsrampen von -100 bis +70 mV (A: 20 mV/s) bzw. von -50 bis +50 mV (C: 100 mV/s) mit steigenden Dosen von U73122 (A) bzw. Bupivacain (C) erzeugt. Als Kontrolle wurde am Ende jeweils 10 mM TEA appliziert.

(B), (D) Dosis-Wirkungskurven wurden für U73122 ($n = 6$), U73343 (von niedrigster zu höchster Konzentration: $n = 6, 6, 6, 9, 3$) und Bupivacain ($n = 6$) berechnet. Die halbmaximalen inhibitorischen Wirkungskonzentrationen (IC_{50}) betragen 2,25 μM für U73122, 19,45 μM für U73343 und 197 μM für Bupivacain.

(E), (F) Diese Aufnahmen wurden bei einem konstanten Haltepotential von 0 mV durchgeführt. Nach Erreichen eines Steady-States wurden U73122 (E) in aufsteigender Konzentration von 0,3 bis 10 μM bzw. Bupivacain (F) von 30 bis 1000 μM appliziert. Als Kontrolle wurde am Ende jeweils 10 mM TEA appliziert.

Um die Wirkung von U73122 und U73343 auf MaxiK und GIRK vergleichen zu können, wurde die Dosis-Wirkungsbeziehung der MaxiK-Hemmung durch die beiden Substanzen bestimmt.

Die Abbildung 3.14A zeigt eine typische Messung mit Rampenprotokollen an HEK-Zellen, die transient mit der MaxiK α -Untereinheit transfiziert waren. Dabei wurde U73122 schrittweise in steigender Konzentration gegeben (0,3 - 10 μ M). Dosisabhängig kam es zu einer deutlichen Abnahme des Auswärtsstroms. Bemerkenswert ist, dass sich die Strommaxima der verschiedenen Rampen fast genau übereinander, d.h. bei derselben Spannung befinden. Wie bei den Messungen in Abbildung 3.12 blockierte U73122 ungefähr 90% des MaxiK-Stroms in einer Konzentration von 10 μ M. Der restliche Strom wurde als Kontrolle mit 10 mM TEA blockiert. Genauso kann man die Substanzen in steigender Konzentration bei einem konstanten Haltepotential geben. Die Abbildung 3.14E zeigt eine typische Messung bei einem Haltepotential von 0 mV. Nachdem der Strom über einige Zeit konstant geblieben ist (Steady-State), wurde U73122 in steigender Konzentration von 0,3 bis 10 μ M hinzugegeben. Dosisabhängig kam es wiederum zu einer deutlichen Abnahme des Stroms.

Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven (Abbildung 3.14B) ergaben sich für U73122 ein IC_{50} -Wert von $2,25 \pm 0,71 \mu$ M und für U73343 ein IC_{50} -Wert von $19,28 \pm 0,3 \mu$ M.

Eine Substanz, die ein ähnlich selektives Wirkprofil auf die Kanäle der Kir-Familie hat wie U73122 und U73343, ist das Lokalanästhetikum Bupivacain, das ebenfalls den GIRK-Strom in micromolaren Dosen blockiert, während es keine Wirkung auf ROMK und IRK zeigt (Zhou et al., 2001a). Deshalb stellte sich die Frage, ob Bupivacain auch mit dem MaxiK-Kanal interagiert.

Tatsächlich war Bupivacain in der Lage, den MaxiK unter denselben Messbedingungen zu blockieren, die für U73122 / U73343 benutzt wurden (Abbildung 3.14C,F). Die Abbildung 3.14C zeigt eine typische Whole-Cell-Messung mit Rampenprotokollen von HEK-Zellen, die transient mit der MaxiK α -Untereinheit transfiziert waren. Bupivacain wurde schrittweise in steigender Konzentration von 30 bis 1000 μ M appliziert. Anschließend wurde 10 mM TEA als Kontrolle gegeben. Dosisabhängig kam es zu einer deutlichen Abnahme des Stroms. Die Abbildung 3.14F zeigt eine entsprechende Messung bei einem konstanten Haltepotential von 0 mV. Wiederum wurde Bupivacain in steigender Konzentration appliziert. Dosisabhängig kam es genauso zu einer deutlichen Abnahme des Stroms, wobei Bupivacain in einer Konzentration von 1000 μ M sogar eine stärkere Wirkung zeigte als 10 mM TEA. Die Stromschwankungen kurz vor Applikation der nächsten Konzentration kamen durch kurzfristige Vermischung mit Badlösung zustande, weil sich das Lokalanästhetikum extrem schnell auswaschen ließ.

Genau wie für U73122 und U73343 wurde aus Messungen wie in den Abbildungen 3.14C und F eine Dosis-Wirkungskurve für Bupivacain erstellt (Abbildung 3.14D). Dabei ergab sich ein IC_{50} -Wert von $197 \pm 12 \mu\text{M}$.

Vergleicht man die Wirkung von U73122 und Bupivacain, dann fällt ein deutlicher Unterschied auf. Während sich bei den Rampen von U73122 / U73343 die Strommaxima der verschiedenen Rampen fast genau übereinander befinden (Abbildung 3.14A), führte Bupivacain zu einer deutlichen und dosisabhängigen Rechtsverschiebung der I-V-Beziehung (Abbildung 3.14C).

3.2.11 Untersuchung der Ca^{2+} -Abhängigkeit des U73122-Blocks am MaxiK

Es stellt sich weiterhin die Frage, an welcher Struktur des MaxiK U73122 und U73343 angreifen. Betrachtet man das Alignment der Aminosäuresequenzen von MaxiK und GIRK (Abbildungen 3.18 und 3.19), dann fallen Gemeinsamkeiten im Bereich der Ca^{2+} -Bindungsstellen des MaxiK auf. Es könnte also sein, dass U73122 mit diesen Ca^{2+} -Sensor-Domänen interagiert.

Deshalb wurden Versuche durchgeführt, die die Ca^{2+} -Abhängigkeit von MaxiK-Kanälen und die Wirkung von U73122 darauf untersuchen. Besonders interessant dabei sind die beiden „Extrem“- Ca^{2+} -Konzentrationen der MaxiK-Aktivierung - zum einen mit gesättigter Ca^{2+} -Konzentration ($300 \mu\text{M } Ca^{2+}$) in der Pipettenlösung für einen maximalen Effekt auf die Aktivierung und zum anderen eine nominell Ca^{2+} -freie Pipettenlösung (BAPTA-gepuffert) für eine minimale Wirkung auf die Aktivierung.

Da die Kanäle in Ca^{2+} -freier Lösung erst viel später aktivieren, muss man deutlich höhere Spannungen verwenden. Daher wurden bei diesen Versuchen Spannungstreppen von -80 bis +130 mV verwendet, während für die Messungen mit der hohen Ca^{2+} -Konzentration in der Pipette Spannungstreppen von -80 bis +80 mV durchgeführt wurden. Die Abbildung 3.15A zeigt eine typische Whole-Cell-Messung mit $300 \mu\text{M } Ca^{2+}$ in der Pipettenlösung, während Abbildung 3.15B eine entsprechende Messung mit Ca^{2+} -freier Pipettenlösung zeigt. Die jeweils linken Messungen wurden unter Kontroll-Bedingungen aufgenommen. Erwartungsgemäß war der Strom in Ca^{2+} -freier Lösung deutlich kleiner, obwohl die obere Treppe sogar bei +130mV aufgenommen wurde (Abbildung 3.15B). Durch Gabe von U73122 in den jeweils rechten Messungen nahm der Strom in beiden Versuchen deutlich ab.

Nach Aufnahme der Spannungstreppen wurde der maximale Strom nach jedem Spannungssprung vor und nach Gabe von U73122 bestimmt und daraus jeweils die Leitfähigkeit mit der Gleichung

$$G = \frac{I}{V - E_K} \quad (3.1)$$

berechnet. Dabei ist I der jeweils abgelesene Spitzenstrom (I_{\max}) beim Kommandopotential V. E_K ist das Gleichgewichtspotential für K^+ unter den Messbedingungen (-88 mV).

Aus den Punkten wurde mit einer sigmoidalen (Boltzmann-) Gleichung der Form

$$G = G_{\min} + \frac{G_{\max}}{1 + e^{\frac{V_{\text{mid}} - V}{k}}} \quad (3.2)$$

die Aktivierungskurve berechnet, wobei V_{mid} die halbmaximale Aktivierung und k den Slope-Faktor (Steigung) darstellen. G_{\max} ist die maximale und G_{\min} die minimale Leitfähigkeit. G_{\min} wurde in allen Messungen auf null gesetzt.

Um die relative Abnahme der Leitfähigkeit in den Grafiken besser sichtbar zu machen, wurde die maximale Leitfähigkeit der Kontrollmessungen in den Abbildungen 3.15C+D auf 1,0 normiert. Anschließend wurden die Werte für die entsprechenden Messungen gemittelt und in den Abbildungen 3.15C+D gegen die Spannungen aufgetragen.

Vergleicht man zunächst nur die beiden Kontrollkurven in den Abbildungen 3.15C+D, so ist die Kurve in Ca^{2+} -freier Lösung wie erwartet deutlich nach rechts - zu positiveren Potentialen hin - verschoben. Während der Strom in $300 \mu\text{M } Ca^{2+}$ schon bei etwa -40 mV aktiviert, geschieht dies beim Strom in $0 \mu\text{M } Ca^{2+}$ erst bei ca. +50 mV. Dies stimmt mit den Ergebnissen verschiedener Veröffentlichungen überein, wonach eine Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Spannungsabhängigkeit der Strom-Aktivierung zu positiveren Potentialen hin verschiebt (Latorre et al., 1989; Schreiber et al., 1999).

In beiden Abbildungen (Abbildungen 3.15C+D) sieht man eine deutliche Reduktion der Leitfähigkeit durch U73122. Bei den Messungen mit Maximal- Ca^{2+} in der Pipette (Abbildungen 3.15A+C) reduzierte U73122 die maximale MaxiK-Leitfähigkeit von $101,7 \pm 15,1 \text{ nS}$ auf $61,6 \pm 11,3 \text{ nS}$ ($n = 9, p < 0.0025$). In Ca^{2+} -freier Lösung (Abbildungen 3.15B+D) reduzierte U73122 die Leitfähigkeit von $22,26 \pm 4,66 \text{ nS}$ auf $15,05 \pm 1,79 \text{ nS}$ ($n = 6, p < 0.05$). Diese Reduktion der maximalen Leitfähigkeit liegt sowohl bei Maximal- Ca^{2+} in der Pipette (Reduktion um 60,6%) als auch bei Ca^{2+} -freier Lösung (Reduktion um 67,6%) in der gleichen Größenordnung.

Interessanterweise verursachte U73122 in Abbildung 3.15C auch einen signifikanten Links-Shift von V_{mid} , und zwar von $22,8 \pm 6,5$ mV auf $6,0 \pm 5,9$ mV ($n = 9$, $p < 0.05$). Dieser Shift der Strom-Aktivierung Richtung Hyperpolarisation wird noch deutlicher, wenn man beide Aktivierungskurven auf die maximale Leitfähigkeit normiert, wie im Inset in Abbildung 3.15C zu sehen ist.

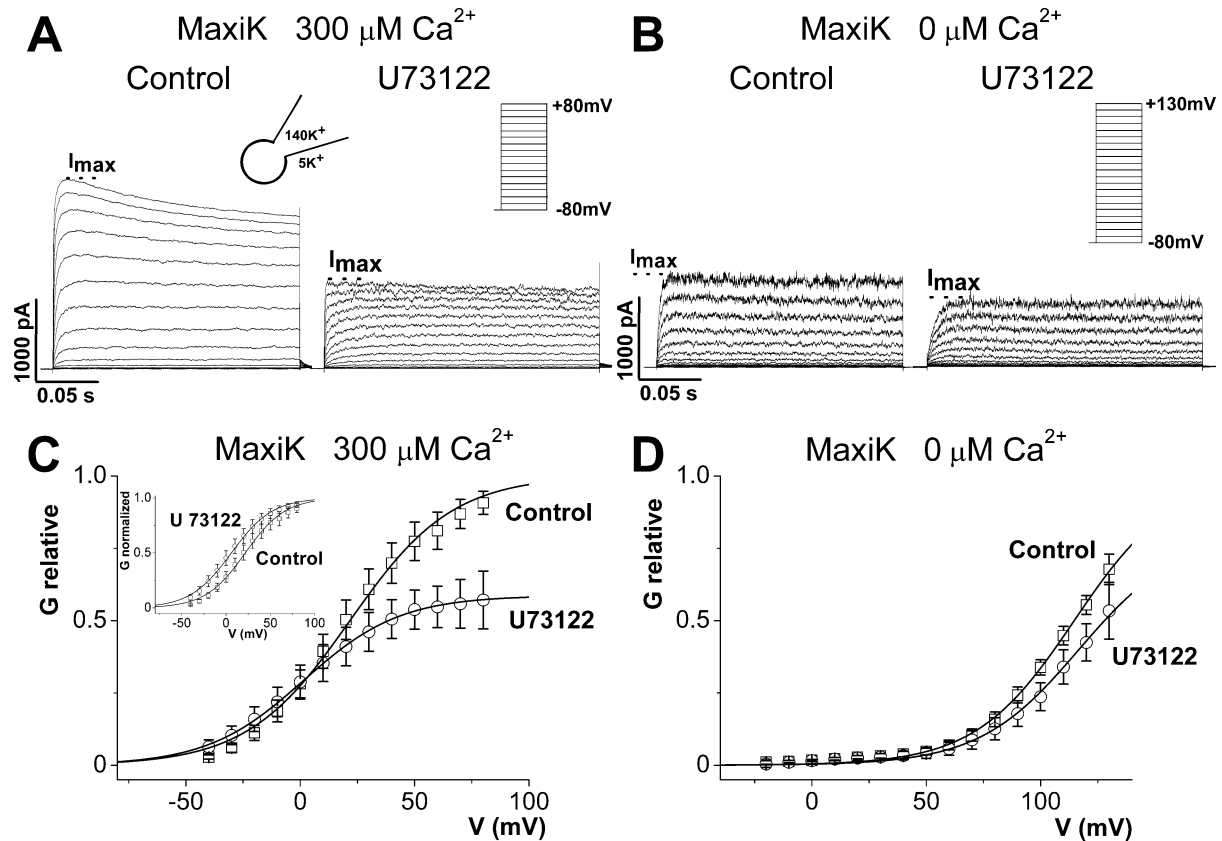


Abbildung 3.15. Wirkung von U73122 auf den MaxiK (BK) in Abhängigkeit von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.

Whole-Cell-Messungen von HEK293-Zellen, die transient mit der MaxiK α -Untereinheit transfiziert waren, wurden bei zwei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen in der Pipette ($300 \mu M Ca^{2+}$: $n = 9$; Ca^{2+} -freie Pipettenlösung gepuffert mit 10 mM BAPTA ($0 \mu M Ca^{2+}$): $n = 6$) vor und nach Gabe von $10 \mu M$ U73122 aufgenommen. Die MaxiK-Ströme wurden mit Spannungstrepfen von -80 bis $+80$ mV (Messungen mit $300 \mu M Ca^{2+}$) bzw. bis $+130$ mV (Messungen mit $0 \mu M Ca^{2+}$) gemessen.

(A), (B) Diese Aufnahmen zeigen vier typische Messungen mit Spannungstrepfen mit $300 \mu M Ca^{2+}$ (A) und mit $0 \mu M Ca^{2+}$ (B) in der Pipette. Die jeweils linken Messungen sind die Kontroll-Messungen, während die jeweils rechten Messungen nach U73122-Gabe aufgenommen wurden. Die Messprotokolle sind in den Insets dargestellt.

(C), (D) Diese beiden Diagramme zeigen die Aktivierungskurven des MaxiK vor und nach Gabe von U73122 bei einer Ca^{2+} -Konzentration von $300 \mu M$ (C) bzw. in Ca^{2+} -freier Lösung (D). Das Inset in (C) zeigt die Aktivierungskurven bei $300 \mu M Ca^{2+}$, normalisiert auf G_{max} ($n = 9$).

Aus diesen Versuchen ergeben sich zwei Erkenntnisse: Zum ersten ist die hemmende Wirkung von U73122 auch in nominell Ca^{2+} -freier Lösung in der gleichen Größenordnung erhalten. Dies deutet darauf hin, dass der Block durch die beiden Substanzen Ca^{2+} -

unabhängig ist. Zum zweiten wird deutlich, dass U73122 anders als Bupivacain zu wirken scheint. Während Bupivacain den MaxiK-Strom durch einen Rechts-Shift reduzierte, also die Strom-Aktivierung in Depolarisations-Richtung verschob (Abbildung 3.14C), war die Hemmung des Stroms durch U73122 mit einer Linksverschiebung der Aktivierungskurve verbunden (Abbildung 3.15C).

3.2.12 Wirkungen von U73122 und U73343 auf den MaxiK in Einzelkanal-Messungen

Um mehr Informationen über den möglichen Wirkungsmechanismus des U73122-Blocks zu bekommen, wurden Einzelkanal-Messungen am MaxiK-Kanal durchgeführt. Diese Experimente wurden in der Inside-Out-Konfiguration mit gesättigter Ca^{2+} -Konzentration in der internen Badlösung (300 μM) durchgeführt. Wie bei den Einzelkanal-Messungen am GIRK wurden auch bei diesen Messungen die Substanzen über das Filament gegeben - also von der zytosolischen Seite der Zellmembran. Dabei erwartet man keinen Unterschied in der Wirkung im Vergleich zu den Whole-Cell-Messungen, weil U73122 und U73343 in DMSO gelöst sind und so leichter die Membran durchdringen können.

Die Abbildung 3.16A zeigt zwei typische Einzelkanal-Messungen am MaxiK bei Haltepotentialen von +20 mV und +80 mV, während die Abbildung 3.16B die entsprechenden Messungen bei den gleichen Spannungen nach Applikation von 10 μM U73122 darstellt. Diese Art von Experimenten ist in der I-V-Beziehung in Abbildung 3.16C zusammengefasst. Die Offen-Wahrscheinlichkeit der Einzelkanal-Spuren ist in Abbildung 3.16D gegen die entsprechenden Spannungen aufgetragen.

Betrachtet man die Abbildungen 3.16A, C und D, dann fallen sofort drei Besonderheiten auf, die typisch für den nativen MaxiK auf Einzelkanalniveau sind. Der MaxiK trägt seinen Namen wegen seiner außergewöhnlich großen Einzelkanalleitfähigkeit. So zeigte er unter den verwendeten Messbedingungen bei einer Spannung von +20 mV schon eine Amplitude von etwa 6,5 pA (Abbildungen 3.16A+C). Der GIRK dagegen erreichte selbst bei maximaler Aktivierung (-80 mV) nur Amplituden von 2,55 pA (siehe Abschnitt 3.2.3). Die entsprechenden Einzelkanalleitfähigkeiten betragen 81 pS beim MaxiK und 33 pS beim GIRK. Im Vergleich zur Literatur war die hier bestimmte Leitfähigkeit des MaxiK etwas geringer, da die Literaturwerte (100 - 250 pS) in symmetrischen K^+ -Konzentrationen bestimmt wurden.

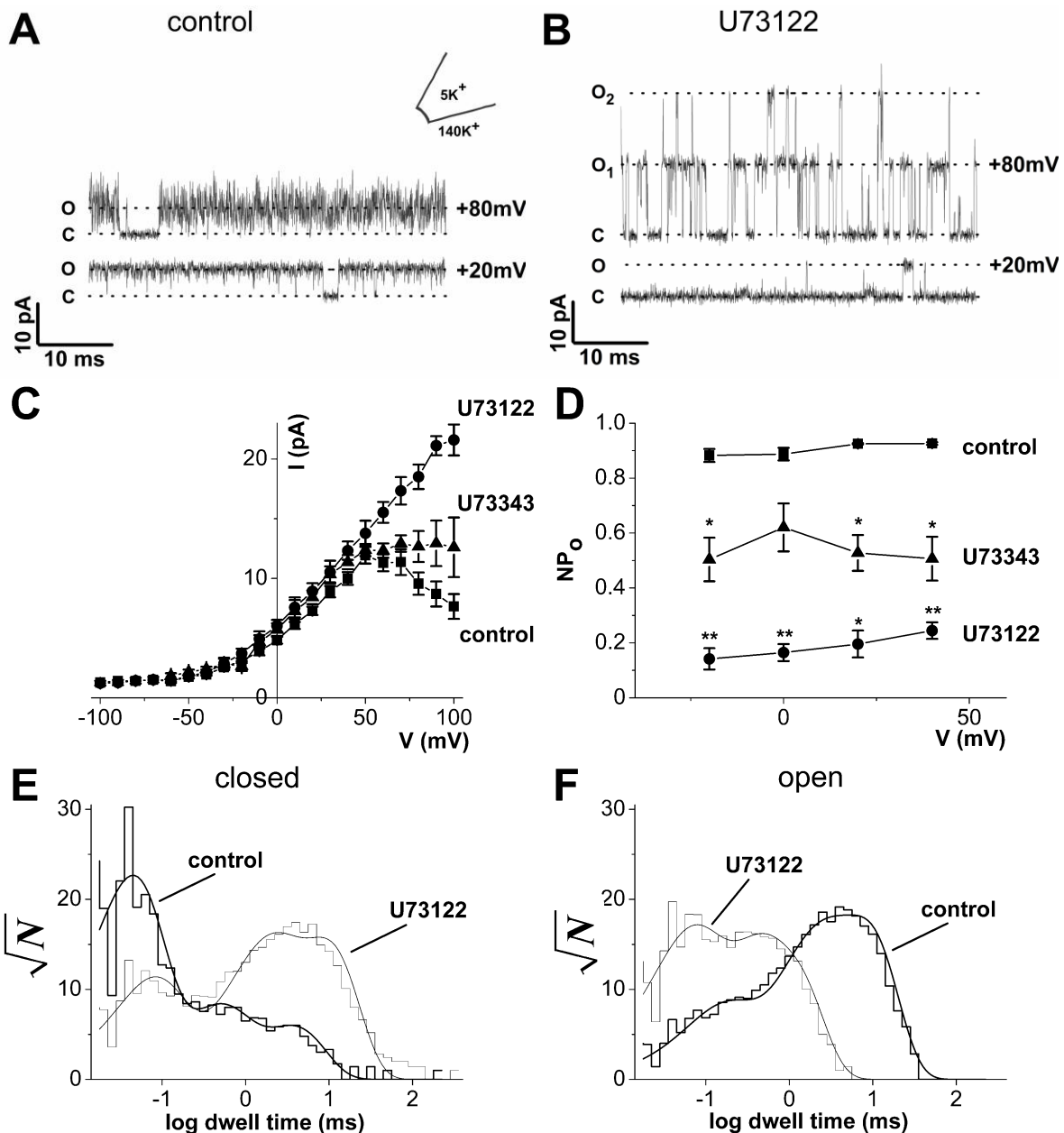


Abbildung 3.16. Wirkungen von U73122 und U73343 auf MaxiK in Einzelkanal-Messungen.

HEK293-Zellen, die stabil mit der MaxiK α und β 1-Untereinheit transfiziert waren, wurden in der Inside-Out-Konfiguration bei verschiedenen Haltepotentialen gemessen. U73122 und U73343 wurden in einer Konzentration von 10 μ M in die Badlösung (d.h. an die zytosolische Seite des Patches) appliziert.

(A), (B) Diese Aufnahmen zeigen typische Messungen bei einem konstanten Haltepotential von jeweils +20 mV und +80 mV in Badlösung (A) und bei Gabe von 10 μ M U73122 (B) (C: Geschlossen-Niveau; O, O1, O2: Offen-Niveaus).

(C) Die I-V-Beziehung der Einzelkanal-Ströme, aufgenommen jeweils bei einem konstanten Haltepotential, wurde für interne Lösung (Control, n = 14), 10 μ M U73122 (n = 10) und 10 μ M U73343 (n = 7) dargestellt.

(D) Die Offen-Wahrscheinlichkeit (NP_o) wurde für eine Zeitserie von 25 s bei verschiedenen Haltepotentialen für interne Lösung (Control, n = 3), 10 μ M U73122 (n = 3) und 10 μ M U73343 (n = 3) ermittelt. Die Signifikanz wurde jeweils gegen die Kontrollperiode getestet. * p < 0.05, ** p < 0.01

(E), (F) Dwell-Time-Histogramme von Messungen wie in (A) und (B) vor (control) und nach Applikation von U73122 für Geschlossen- (E) und Offen-Level (F). Die Berechnungen wurden für 25 s-Zeitserien durchgeführt, die bei +20 mV aufgenommen wurden. Die Histogramme wurden mit der Gleichung 2.3 angepasst. Das beste Fit-Ergebnis ergab sich für die Geschlossen- und die Offen-Ereignisse mit jeweils drei Zeitkonstanten.

Die zweite Besonderheit des MaxiK ist eine sehr hohe Offenwahrscheinlichkeit. In gesättigter Ca^{2+} -Konzentration (30 - 300 μM) erhielt ich Offenwahrscheinlichkeiten von über 90%. Die mittlere Offenwahrscheinlichkeit (NP_o) der Kontrollperiode betrug 0,95 bei +20 bzw. 0,87 bei +80 mV (Abbildungen 3.16A, D).

Die Aufnahmen in Abbildung 3.16A und die I-V-Kurve in Abbildung 3.16C enthüllen das dritte typische Merkmal der MaxiK-Kanäle. Die I-V-Beziehung der MaxiK und somit die Größe des Einzelkanal-Stroms stieg zunächst kontinuierlich an und zeigte dann ein Maximum bei ca. +50 mV. Bei weiterer (unphysiologischer) Depolarisation nahm der sichtbare Einzelkanal-Strom wieder ab - trotz einer höheren treibenden Kraft für K^+ . In Abbildung 3.16A ist der Einzelkanal-Strom bei +20 und +80 mV fast gleich. Das Ergebnis ist ein Abknicken der I-V-Beziehung ab etwa +50 mV, die sogenannte negative Kennlinie, die man in Abbildung 3.16C erkennen kann. Dieses Abknicken der I-V-Beziehung paßt aber auch zu dem Verhalten der MaxiK in Whole-Cell-Messungen, in denen es ebenfalls zu einem Abknicken der Rampen bei höheren Spannungen kam (Abbildung 3.12A). Mechanistisch wird dieses Entkoppeln der gemessenen Stromamplitude von der treibenden Kraft (für K^+) dem sehr schnellen Schalten („flickering“) des Selektivitätsfilters zugeschrieben, das instabil werden soll, wenn es nicht mehr genug K^+ -Ionen enthält (siehe Abschnitt 4.5; Schroeder & Hansen, 2007; 2008).

Gab man nun U73122 bzw. U73343, dann zeigte sich, dass sie zwei deutliche Effekte auf das normale Schaltverhalten der MaxiK-Kanäle haben. Dabei war die Wirkung von U73122 stärker als die von U73343, wie man es auch nach den Whole-Cell-Messungen erwarten konnte, in denen U73122 ebenfalls eine größere Wirkung hatte (Abbildung 3.14B).

Erstens wurde die Offenwahrscheinlichkeit in allen getesteten Spannungen (von -40 bis +60 mV) von U73343 und U73122 signifikant reduziert (Abbildung 3.16D). Im Vergleich zu den Kontrollperioden reduzierten die Substanzen die Offenwahrscheinlichkeit von etwa 90% (Kontrolle) auf 50% (U73343) bzw. sogar ca. 20% (U73122).

Der zweite Effekt, den U73122 und U73343 auf die Kanäle haben, wird in Abbildung 3.16B+C deutlich. In der I-V-Beziehung wurde die offensichtliche Abnahme des Stroms bei Potentialen über +50 mV zum Teil (U73343) oder vollständig (U73122) aufgehoben. Vergleicht man die oberen Stromspuren in den Abbildungen 3.16A+B, die bei +80 mV in der An- und Abwesenheit von U73122 aufgenommen wurden, dann fällt die Wirkung von U73122 auf das Schaltverhalten besonders auf: Unter Kontrollbedingungen (Abbildung 3.16A) schien der Kanal bei hohen Potentialen in eine extrem schnelle Schaltweise („flickering“) zu verfallen (s. o.) und führte so zu einem ausgeprägten Rauschen im Offen-Level. Dies erschwert eine eindeutige Bestimmung der Stromamplitude. U73122 dagegen verlangsamte das Schalten insgesamt, und verhinderte so das Flickern, so dass die

individuellen Schaltereignisse voll aufgelöst werden konnten. Als Konsequenz bleibt in Abbildung 3.16B die Rausch-Amplitude der Einzelkanal-Ströme im Geschlossen- und Offen-Level fast gleich, und die Einzelkanal-Ströme scheinen eine viel größere Amplitude zu haben. Die I-V-Kurve in Abbildung 3.16C wurde durch die U73122-Applikation im gesamten Spannungs-Umfang linearisiert, so wie es durch die höhere treibende Kraft für K^+ auch zu erwarten gewesen wäre.

Als nächstes wurden Dwell-Time-Histogramme erstellt (Abbildungen 3.16E+F), um eine Veränderung der Zeitkonstanten des Kanalschaltens durch U73122 zu erkennen. Es wurden jeweils Zeitreihen von 25 s bei +20 mV aufgenommen. Dabei ergaben sich jeweils drei Zeitkonstanten für die Offen- und Geschlossen-Level. Die Abbildung 3.17A fasst die Zeitkonstanten aus den Abbildungen 3.16E+F zusammen. Zur besseren Darstellung wurde die y-Achse logarithmiert.

Unter U73122 wurden die Geschlossen-Intervalle im Vergleich zur Kontroll-Periode verlängert, d.h. die Maxima der Kurven verschieben sich nach rechts, hin zu längeren Dwell-Times (Abbildungen 3.16E und 3.17A). Die Offen-Intervalle dagegen wurden von U73122 deutlich nach links, also zu kürzeren Intervallen hin verschoben (Abbildungen 3.16F, 3.17A). In Abbildung 3.17A fällt auf, dass besonders die jeweils längeren Zeitkonstanten durch U73122 verändert wurden, die Geschlossen-Intervalle sind verlängert und die Offen-Intervalle verkürzt.

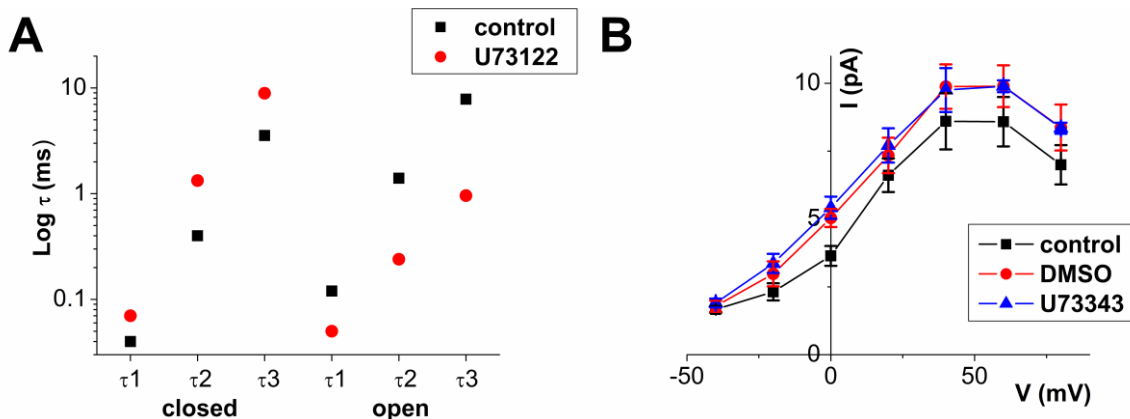


Abbildung 3.17. Einzelkanal-Messungen von MaxiK-Kanälen.

HEK293-Zellen, die stabil mit der MaxiK α und β 1-Untereinheit transfiziert waren, wurden in der Inside-Out-Konfiguration bei verschiedenen Haltepotentialen gemessen.

(A) Das Diagramm zeigt die Zeitkonstanten aus den Dwell-Time-Histogrammen (Abbildung 3.16E+F), jeweils vor (control) und während Applikation von U73122.

(B) Die I-V-Beziehung der Einzelkanal-Ströme, aufgenommen jeweils bei einem konstanten Haltepotential, ist dargestellt für interne Lösung, 0,1% DMSO und 10 μ M U73343 ($n = 4$). DMSO und U73343 wurden nacheinander in die Badlösung appliziert.

Alle Messungen mit U73343 zeigten eine Wirkung, die in der Mitte zwischen den Kontrollmessungen und U73122 liegt. Dies betraf sowohl die Offen-Wahrscheinlichkeit (Abbildung 3.16D) als auch die I-V-Kurve (Abbildung 3.16C). Dies ist vereinbar mit der höheren IC_{50} von U73343 in den Whole-Cell-Messungen aus der Dosis-Wirkungs-Kurve in Abbildung 3.14B.

In der I-V-Kurve scheinen die Ströme unter U73122 und U73343 ab -20 mV im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht zu sein. Dies kann dem DMSO als Lösungsmittel zugeschrieben werden. Die Abbildung 3.17B zeigt ein entsprechendes Kontroll-Experiment, in dem eine I-V-Kurve für 0,1%-iges DMSO in Badlösung erstellt wurde. Dabei stimmen die Kurven von DMSO und U73343, die nacheinander gemessen wurden, fast überein.

3.3 Untersuchung von trankierten MaxiK im heterologen Expressionssystem

GIRK und MaxiK gehören zu verschiedenen Ionenkanal-Familien und sind strukturell und funktionell sehr unterschiedlich. Trotzdem wurden beide Kanäle durch U73122 und U73343 gehemmt. Gleichzeitig waren die Substanzen auch in der Lage, zwischen eng verwandten Kanälen einer Familie zu differenzieren. So zeigten sie keine Wirkung auf weitere Kanäle der Kir-Familie wie den ROMK (siehe Abschnitt 3.2.4) oder den IRK (siehe Abschnitt 3.2.5). Die wahrscheinlichste Erklärung für diese hohe Selektivität von U73122 und U73343 ist eine homologe Stelle an GIRK und MaxiK, über die die Substanzen wirken können.

Um diese homologen Regionen der beiden Kanäle herauszufinden, habe ich ein Alignment ihrer Aminosäuresequenzen erstellt und mit den Sequenzen der ROMK- und IRK-Kanäle verglichen. Die Abbildung 3.18 zeigt dieses Alignment, und zwar der vier Kanäle Kir1.1, Kir2.1, Kir3.1 und MaxiK. Da gemeinsame Bereiche innerhalb der Kir-Familie wahrscheinlich nicht der Angriffsziel von U73122 sind, wurde zuerst ein Alignment der Kir-Familie durchgeführt, d.h. der Kir1.1 und der Kir2.1 wurden mit dem GIRK (Kir3.1) verglichen. Erwartungsgemäß gibt es die besten Übereinstimmungen im Bereich der Pore und der beiden TM-Segmente M1 und M2. Anschließend wurde der GIRK mit dem MaxiK verglichen. Auch hier gibt es Übereinstimmungen im Bereich der Pore und der Segmente S5 und S6 (entsprechen M1 und M2 beim GIRK). Dies ist nicht verwunderlich, da diese Bereiche in der Familie der K^+ -Kanäle relativ konserviert sind. Erstaunlich sind allerdings die Übereinstimmungen im C-Terminus. Dies sind Bereiche, in denen es nur Gemeinsamkeiten zwischen GIRK und MaxiK gibt. Die entsprechenden Bereiche sind blau und rot gekennzeichnet.

Abbildung 3.18. Alignment der Aminosäuresequenzen von Kir1.1, Kir2.1, Kir3.1 und MaxiK (erstellt mit der der MATCH-BOX-Software; Depiereux et al., 1997).

In diesem Fall wurden zwei verschiedene Alignments unabhängig voneinander durchgeführt: Zuerst wurde ein Alignment der Kir-Familie durchgeführt, d.h. Kir1.1 und Kir2.1 wurden mit GIRK (Kir3.1) verglichen. Die entsprechenden Scores stehen in der oberen Reihe. Dabei werden gleiche oder ähnliche Aminosäuren mit niedrigen Zahlen und schwächere Übereinstimmung mit höheren Zahlen bewertet. Keine Zahl bedeutet keine Gemeinsamkeit. Die aneinander ausgerichteten Aminosäuren sind außerdem klein geschrieben. Anschließend wurde GIRK mit MaxiK verglichen. Die entsprechenden Scores dazu stehen in der unteren Reihe. Die jeweiligen Sekundärstruktur-Elemente sind über bzw. unter den AS-Sequenzen notiert (www.uniprot.org/P63251; www.uniprot.org/Q12791). Wichtige Bereiche für die Kanal-Funktion oder Modulation wurden besonders markiert: Kursiv sind jeweils die Transmembran-Segmente dargestellt und dunkelgrau ist das Poren-Motiv „GYG“ hinterlegt, das bei allen vier Kanälen konserviert ist. Schwarz unterstrichen sind die bekannten PIP₂-Bindungsstellen bei Kir2.1 und Kir3.1, und die bisher bekannten Bindungsstellen für die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins beim GIRK sind hellgrau hinterlegt (Huang et al., 1995; Slesinger et al., 1995; Huang et al., 1997; He et al., 1999; Zhang et al., 1999; Mark & Herlitze, 2000; Xiao et al., 2003; Du et al., 2004; Review von Logothetis et al., 2007a). Die größten Gemeinsamkeiten im Alignment zwischen GIRK und MaxiK wurden blau bzw. rot markiert und beziehen sich auf markierte Bereiche in Abbildung 3.19.

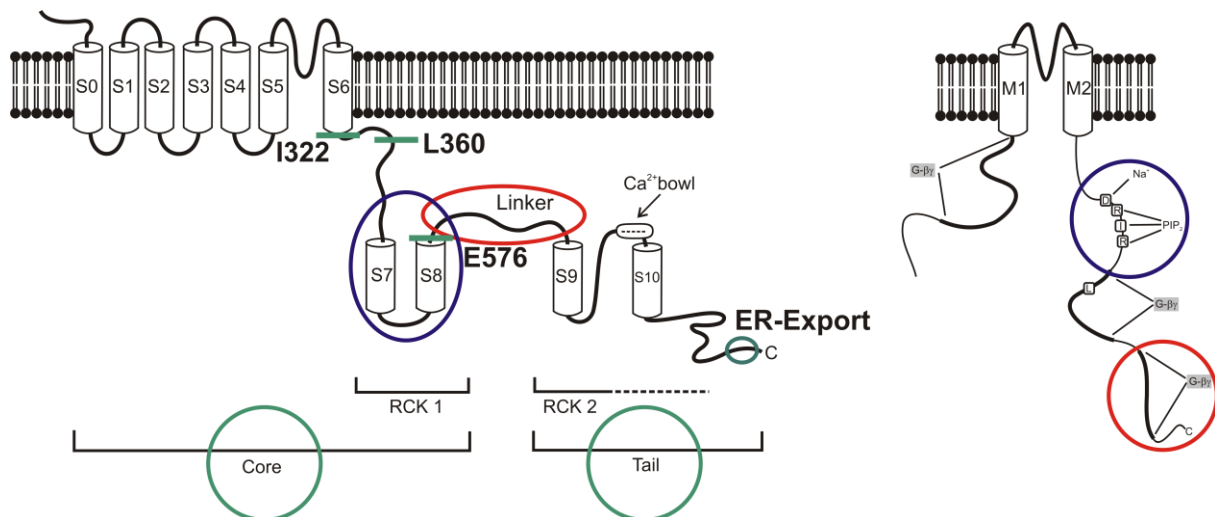


Abbildung 3.19. Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von MaxiK und GIRK (modifiziert nach Magleby, 2003 bzw. Mark & Herlitze, 2000).

Die blauen und roten Kreise markieren die entsprechenden Sequenzhomologien aus Abbildung 3.18. Die grünen Balken zeigen die Deletionsstellen für die MaxiK-Mutanten an.

Diese offensichtlichen Homologien aus dem Alignment wurden anschließend in die schematischen Zeichnungen der Sekundärstruktur der beiden Kanäle eingetragen (Abbildung 3.19). Wie durch die Kreise in den gleichen Farben dargestellt, liegen die Sequenz-Ähnlichkeiten in Bereichen, die für die Modulation der jeweiligen Kanäle entscheidend sind. Beim GIRK liegen sie im Bereich der Bindungsstellen von PIP₂ bzw. der Bindungsstelle für die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins. Beim MaxiK liegen sie im Bereich der sog. „Regulator of Conductance for K⁺-“ (RCK)1 -Domäne, was S7 und S8 entspricht (blauer

Kreis) bzw. dem Linker zwischen RCK1 und RCK2 (zwischen S8 und S9; roter Kreis; Abbildung 3.19).

Nach dem Alignment ist es naheliegend, die Bindungsstelle für U73122 in den rot bzw. blau markierten Bereichen zu suchen. Da es beim MaxiK bereits Studien über weit reichende Mutationen im C-Terminus gibt, wurden im Folgenden zunächst Deletionsmutationen am MaxiK konstruiert und untersucht.

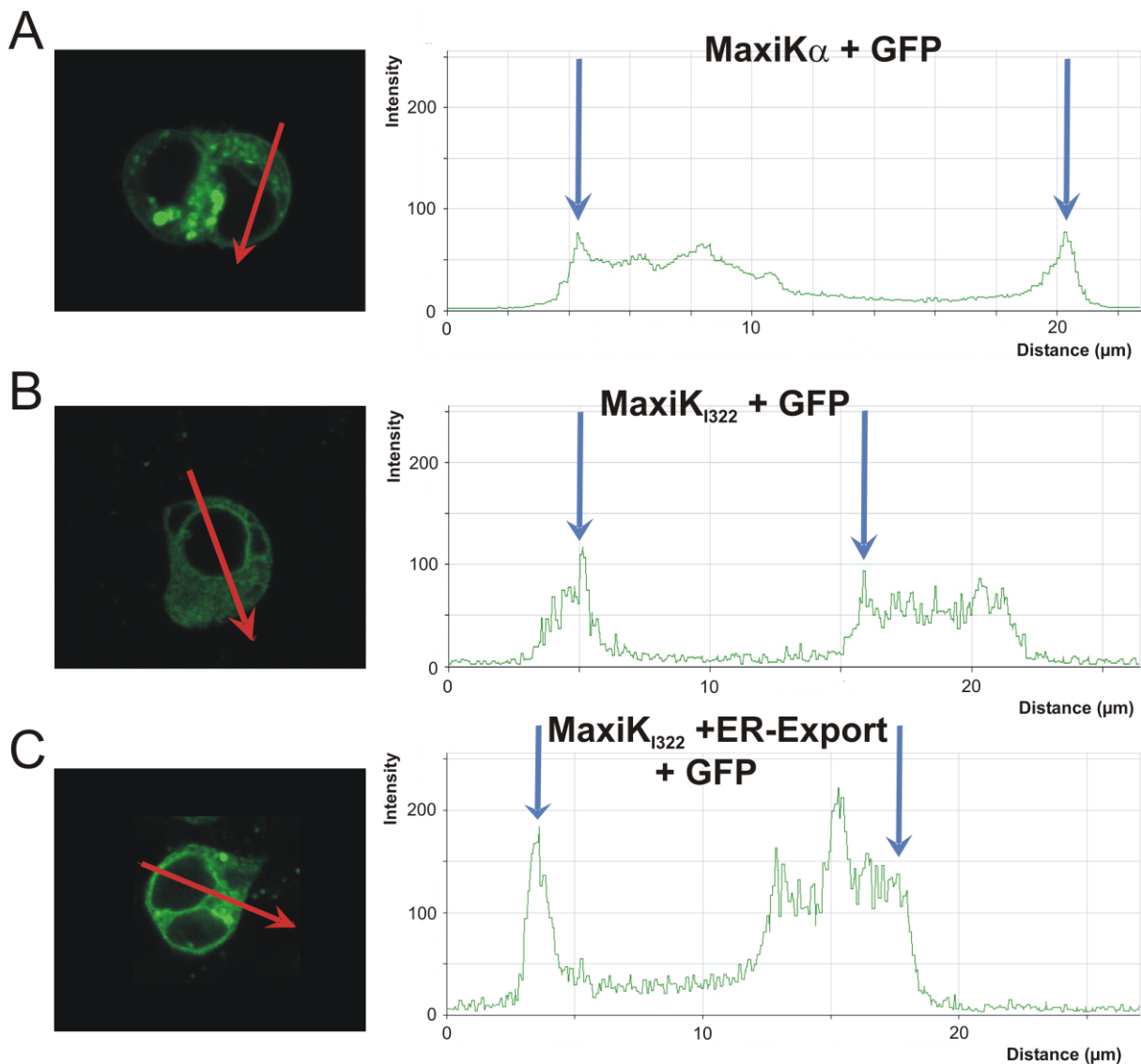


Abbildung 3.20. Expressionsmuster unterschiedlicher MaxiK-Konstrukte.

Die Abbildungen A-C zeigen HEK293-Zellen unter dem konfokalen Mikroskop, die mit Fusionsproteinen aus den verschiedenen MaxiK-Konstrukten und GFP transfiziert waren. Die Intensität des grünen Farbstoffs wurde entlang des roten Pfeils gemessen und in den jeweils rechten Abbildungen gegen die Länge aufgetragen. Die blauen Pfeile markieren die Peaks der Leuchtintensität.

(A) HEK-Zelle, transfiziert mit einem Fusionsprotein aus der MaxiK α -Untereinheit und GFP. Die maximale Leuchtintensität (blaue Pfeile) erscheint im Bereich der Zellmembran.

(B) HEK-Zelle, transfiziert mit einem Fusionsprotein aus dem MaxiK-Konstrukt I322 und GFP. Die maximale Leuchtintensität erscheint im Bereich der Kernmembran (blaue Pfeile), während Zytoplasma und Zellmembran weniger stark leuchten.

(C) HEK-Zelle, transfiziert mit einem Fusionsprotein aus dem MaxiK-Konstrukt I322 + ER-Export-Sequenz und GFP. Die maximale Leuchtintensität erscheint im Bereich der Zellmembran.

Fusionsprotein aus der MaxiK α -Untereinheit und GFP

Die Abbildung 3.20A zeigt eine transfizierte HEK-Zelle. Die Zelle scheint sich gerade in der Teilungsphase zu befinden und besitzt daher zwei Zellkerne, die als schwarze Löcher erscheinen. Sie war transient transfiziert mit einem Fusionsprotein aus MaxiK α und dem Fluoreszenzmolekül GFP (siehe Abschnitt 2.1.6), d.h. beides liegt auf einem Vektor und wird daher gleich stark und an der gleichen Stelle exprimiert. Bei einer Aufnahme unter dem konfokalen Mikroskop (siehe Abschnitt 2.4) fallen grün leuchtende Punkte im Inneren der Zelle auf, wahrscheinlich im endoplasmatischen Retikulum (ER), aber auch eine deutliche grüne Linie entlang der Zellmembran (Abbildung 3.20A). Diese Linie entspricht den beiden Peaks im rechten Diagramm in Abbildung 3.20A, die durch zwei blaue Pfeile gekennzeichnet sind. Dabei wurde in einem Schnitt durch die Zelle (entlang des roten Pfeils) die Intensität des grünen Farbstoffs gemessen und gegen die Distanz aufgetragen. Der Abstand der beiden Peaks (ca. 16 μm) entspricht also dem Durchmesser der Zelle.

Diese beiden Abbildungen dienen als Vergleich mit den folgenden Mutanten.

Der MaxiK₁₃₂₂

Die ersten der folgenden Experimente basieren auf einer Studie von Piskorowski & Aldrich (2002), die MaxiK-Kanäle direkt hinter S6 den gesamten C-Terminus abgeschnitten haben (MaxiK₁₃₂₃). Dabei sollen die Kanäle die gleiche Ca²⁺-Sensitivität wie der Wildtyp behalten. Die einzigen Unterschiede sollen in einer kürzeren Offenzeit in Einzelkanal-Messungen bestehen, was mit einer veränderten Transitionsenergie des Offen-Zustands des Kanals erklärt wird, und einer etwas geringeren Expression, die einem unterbrochenen Trafficking durch den fehlenden C-Terminus zugeschrieben wird (Piskorowski & Aldrich, 2002). Piskorowski & Aldrich (2002) interpretieren ihre Ergebnisse so, dass die Ca²⁺-Aktivationsstelle bei den trunkierten MaxiK unverändert ist und sich daher nicht im C-Terminus, Ca²⁺-Bowl oder der RCK-Domäne befinden kann.

Daraufhin erschien es sehr vielversprechend, ebenfalls den gesamten C-Terminus abzuschneiden (MaxiK₁₃₂₂), in dem sich die entscheidenden Übereinstimmungen mit dem GIRK befinden (Abbildung 3.19). Diese Deletionskonstrukte sollten anschließend auf die Wirkung von U73122 getestet werden.

Der Vektor wurde wiederum als Fusionsprotein zusammen mit GFP konstruiert, um am konfokalen Mikroskop untersuchen zu können, in welchem Bereich der Zelle sich die

transfizierten Kanäle befinden. In den konfokalen Bildern (Abbildung 3.20B) sieht man aber einen deutlichen Unterschied zu Abbildung 3.20A. Diesmal ist das grün fluoreszierende Protein diffus über das Zytoplasma verteilt mit Maxima in der Kernmembran (blaue Pfeile), während in der Zellmembran keine Anreicherung zu erkennen ist.

Die elektrophysiologischen Messungen bestätigten dieses Ergebnis. Um die elektrophysiologischen Eigenschaften eines mutierten MaxiK zu untersuchen, eignen sich v. a. Rampenprotokolle, da man damit z.B. feststellen kann, ob der Kanal seine auswärts-gleichrichtenden Eigenschaften behalten hat. Die Abbildung 3.21A zeigt Messungen an verschiedenen nativen HEK-Zellen mit Rampenprotokollen von -100 bis +100 mV im Gegensatz zu einer HEK-Zelle, die mit dem MaxiK α -Kanal transfiziert war. Native HEK hatten einen sehr schwach auswärts-gleichrichtende Stromverlauf mit maximalen Werten von ± 200 pA bei -100 bzw. +100 mV im Gegensatz zum MaxiK, der einen stark auswärts-gleichrichtenden Strom mit maximalen Werten von über 4000 pA bei +100 mV zeigte (Abbildung 3.21A). Die Abbildung 3.21B dagegen zeigt den Stromverlauf von HEK-Zellen, die mit MaxiK_{I322} transfiziert waren, wieder im Vergleich zu einer beispielhaften Messung vom MaxiK_{wildtyp}. Auch diese Messungen zeigten genau wie die nicht-transfizierten HEK-Zellen deutlich kleinere Stromwerte als der native MaxiK mit nur minimalen auswärts-gleichrichtenden Eigenschaften.

Zusammen mit den konfokalen Bildern ist die nächstliegende Erklärung dafür, dass die Kanäle nicht bis in die Zellmembran gelangt, sondern in Kernmembran und Zellorganellen verblieben sind (Kwon & Guggino, 2004).

Der MaxiK_{I322} + ER-Export-Sequenz

Neben den biophysikalischen Eigenschaften eines Kanals ist auch die Zahl der Kanäle, die von der Zelle exprimiert wird, entscheidend (Kwon & Guggino, 2004). Mit großer Wahrscheinlichkeit ist das endoplasmatische Retikulum (ER) - obwohl es sich sehr früh im biosynthetischen Sekretionsweg befindet - der bestimmende Faktor für die Menge an Protein, die die Plasmamembran erreicht (Ellgaard et al., 1999).

Der MaxiK_{I322}, dem der gesamte C-Terminus fehlt, war anscheinend nicht in der Lage, das ER zu verlassen, um in die Zellmembran zu gelangen. Der Grund dafür könnte möglicherweise sein, dass die Sequenz, die für den Export des Kanals aus dem ER verantwortlich ist, zusammen mit dem C-Terminus abgeschnitten wurde. Kwon & Guggino (2004) haben eine entsprechende ER-Export-Sequenz für den MaxiK identifiziert, und zwar die Reste 1105 - 1110 (= „DLIFCL“), die sich sehr weit am C-terminalen Ende des Kanalproteins befinden (Abbildung 3.19). Diese Sequenz wird wahrscheinlich von Qualitäts-

Kontroll-Mechanismen des ER erkannt - als finale Überprüfung des Proteinstatus, bevor das Protein zum Golgi-Apparat gelangt. Eine Deletion dieser Region soll den MaxiK im ER zurückhalten (Kwon & Guggino, 2004).

Der nächste Schritt bestand daher darin, an das Ende des deletierten Kanals die Export-Sequenz „DLIFCL“ anzuhängen.

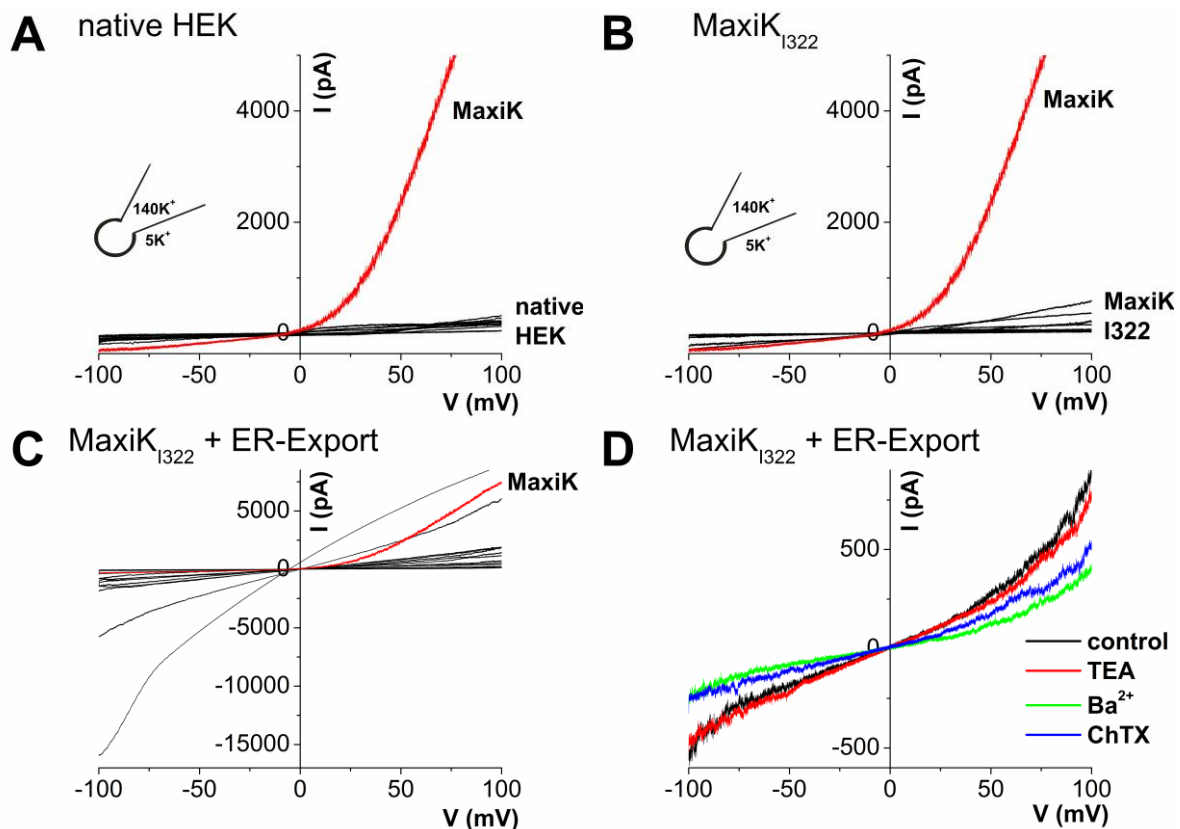


Abbildung 3.21. Messungen von verschiedenen MaxiK-Konstrukten.

Die Whole-Cell-Messungen wurden an nativen HEK293-Zellen (A) und an HEK-Zellen durchgeführt, die mit MaxiK α (rot in A, B, C), MaxiK_{I322} (B) bzw. MaxiK_{I322} + ER-Export-Sequenz (C+D) transfiziert waren. Es wurden jeweils Spannungsrampen von -100 bis +10 mV (20 mV/s) erzeugt.

(A) Diese Aufnahme zeigt Messungen mit Rampen-Protokollen an nativen HEK-Zellen (schwarz) im Vergleich mit dem Strom einer Zelle, die mit dem MaxiK α -Kanal transfiziert war (rot).

(B) In dieser Abbildung werden die Rampen vom MaxiK_{I322} im Vergleich mit der Rampe des nativen MaxiK α (rot) dargestellt (n = 12)

(C) Der MaxiK_{I322} wurde zusammen mit der ER-Export-Sequenz („DLIFCL“) in HEK-Zellen exprimiert. Seine Rampen sind im Vergleich mit der Rampe des nativen MaxiK (rot) dargestellt (n = 15).

(D) Diese Aufnahmen zeigen die Wirkungen von 10 mM TEA, 2 mM Ba²⁺ und 1 μ M Charybdotoxin auf den MaxiK_{I322}.

Die Abbildung 3.20C zeigt die entsprechenden konfokalen Bilder. Tatsächlich ist das grün fluoreszierende Protein deutlich mehr in der Zellmembran vorhanden, wie auch die Auswertung der Intensitätsmaxima beim Schnitt durch die Zelle beweist. Neben einer

größeren Menge von GFP im Zytoplasma befindet sich diesmal eine deutliche Ansammlung auch in der Zellmembran (blaue Pfeile).

Anschließend wurden die Zellen elektrophysiologisch untersucht. Die Abbildung 3.21C zeigt entsprechende Messungen mit Rampenprotokollen von -100 bis +100 mV. Auf den ersten Blick fällt auf, dass die Ströme deutlich größer sind als beim reinen MaxiK₁₃₂₂ (Abbildung 3.21B). Allerdings scheint die Expression sehr unterschiedlich zu sein, da einige Zellen Ströme bis 10 nA bei +100 mV zeigten, während viele Zellen nur Ströme bis höchstens 2 nA hatten. Die Export-Sequenz schien also tatsächlich dafür zu sorgen, dass die deletierten Kanäle in die Zellmembran gelangten. Aber wie sieht der Vergleich des MaxiK₁₃₂₂ + ER-Export-Sequenz mit dem nativen MaxiK (rot) aus? Die Mutation zeigte variable Ströme, aber keinen deutlich auswärts-gerichteten Strom, der für den MaxiK typisch ist. Eine Deletion des gesamten C-Terminus muss also doch große Veränderungen der biophysikalischen Eigenschaften des Kanals bewirken.

Gibt man die typischen Blocker von K⁺-Kanälen, so fällt ein weiterer Unterschied zum MaxiK auf. Die Abbildung 3.21D zeigt die Messungen an einer Zelle, die mit dem MaxiK₁₃₂₂ + ER-Export-Sequenz transfiziert wurde. In Rampenprotokollen zeigte die Gabe von 10 mM TEA keine Wirkung auf den Kanal, während TEA den Strom eines nativen MaxiK komplett blockierte (Abbildung 3.12). TEA wirkt als Porenblocker am MaxiK, und obwohl die Porenregion bei der Mutation nicht verändert wurde, scheinen für die Wirkung weitere Bereiche im C-Terminus erforderlich zu sein. 2 mM Ba²⁺ war dagegen in der Lage, den Strom des mutierten Kanals um etwa 50% zu reduzieren. Ba²⁺ ist allerdings ein sehr unspezifischer Porenblocker von fast allen K⁺-Kanälen und deutlich kleiner als TEA. Aus diesem Grund könnten C-terminale Bereiche weniger wichtig für seine Wirkung sein. Charybdotoxin blockiert v. a. IK und MaxiK. Es schien den mutierten Kanal auch zu hemmen, allerdings weniger stark als Ba²⁺.

Der MaxiK₁₃₂₂ + ER-Export-Sequenz hatte in elektrophysiologischen Messungen keine Ähnlichkeit mit dem nativen MaxiK. Es fehlten die typischen gleichgerichteten Eigenschaften und die Sensitivität gegenüber MaxiK-Blockern. Ein derartig mutierter Kanal kann daher keinen Aufschluß über den Mechanismus geben, der zu der blockierenden Wirkung von U73122 führt.

Der MaxiK_{L360} + ER-Export-Sequenz

Da der MaxiK₁₃₂₂ offensichtlich nicht funktionell war, sollte für die nächsten Versuche der MaxiK etwas weiter distal Richtung C-Terminus deletiert werden, und zwar an Position L360.

Wieder wurde die ER-Export-Sequenz angehängt. Da mit dem MaxiK_{I322} + ER-Export-Sequenz in konfokalen Bildern (Abbildung 3.20C) bewiesen werden konnte, dass die Kanäle in die Zellmembran gelangen, kann man annehmen, dass dies auch für den MaxiK_{L360} + ER-Export-Sequenz gilt.

Die Messungen mit Rampenprotokollen in Abbildung 3.22A zeigen wieder ein ganz unterschiedliches Strommuster. Nicht nur die Stromgröße ist bei den verschiedenen Zellen sehr unterschiedlich, sondern auch der Stromverlauf. Einen deutlichen auswärts-gleichrichtenden Strom wie der native MaxiK (rot) zeigte aber keine Zelle. Die Abbildung 3.22B zeigt eine typische Messung von diesen Kanälen. Während Ba²⁺ den Strom wieder um etwa 50% reduzierte, zeigte U73122 keine Wirkung auf den Kanal. Allerdings hat dies keine besondere Aussagekraft bezogen auf den Wirkort der Substanz, da der MaxiK_{L360} keine MaxiK-typischen Eigenschaften aufwies.

MaxiK-Core (MaxiK_{E576}) + Tail (MaxiK_{S577-L1113})-Konstrukte

Schreiber et al. (1999) haben den MaxiK nach seiner Sequenz in drei verschiedene Regionen eingeteilt (siehe Abschnitt 1.2.4): Erstens die sog. „Core-“ (= Kern-) Region, die den Spannungs-aktivierten K⁺-Kanälen wie dem Shaker ähnelt und daher den Spannungs-Sensor kontrolliert. Sie enthält die hydrophoben Segmente S0 - S8. Als zweites den nicht-konservierten Linker und als drittes die C-terminale „Tail-“ Region, die die Segmente S9 - S10 einschließt und den Ca²⁺-Sensor kontrolliert (Wei et al., 1994; Meera et al., 1997; Schreiber et al., 1999). Die Core- und Tail-Regionen sind in den verschiedenen Spezies hoch konserviert, während der Linker sowohl in der Sequenz als auch in der Länge sehr variabel ist.

Verschiedene Autoren berichten, dass man die Core- und Tail-Region des mSlo trennen und anschließend in Oozyten co-exprimieren kann, wo diese dann assoziieren und funktionelle MaxiK-Kanäle bilden, die nicht vom Wildtyp zu unterscheiden sein sollen (Wei et al., 1994; Meera et al., 1997; Schmalhofer et al., 2005). Wird die Core- oder die Tail-Region dagegen alleine exprimiert, so sollen sie keine funktionellen Kanäle bilden (Wei et al., 1994).

In den folgenden Versuchen wurden zuerst die Core- und die Tail-Region jeweils getrennt exprimiert (Abbildung 3.22C+D). Da die beiden Regionen, die Gemeinsamkeiten mit dem GIRK aufweisen, in der Core-Region (v. a. S7 - S8) und im Bereich des Linkers liegen (Abbildung 3.19), bestand das Slo1-Core-Konstrukt in diesen Versuchen aus den ersten zwei Dritteln des Kanals und endete am C-terminalen Ende von S8 (MaxiK_{E576}). Im Gegensatz zu

Wei et al. (1994), dessen Tail-Konstrukt erst N-Terminal von S9 beginnt, begann das in dieser Arbeit verwendete Tail-Konstrukt schon C-Terminal von S8 (S577) und schloss den Linker mit ein (MaxiK_{S577-L1113}).

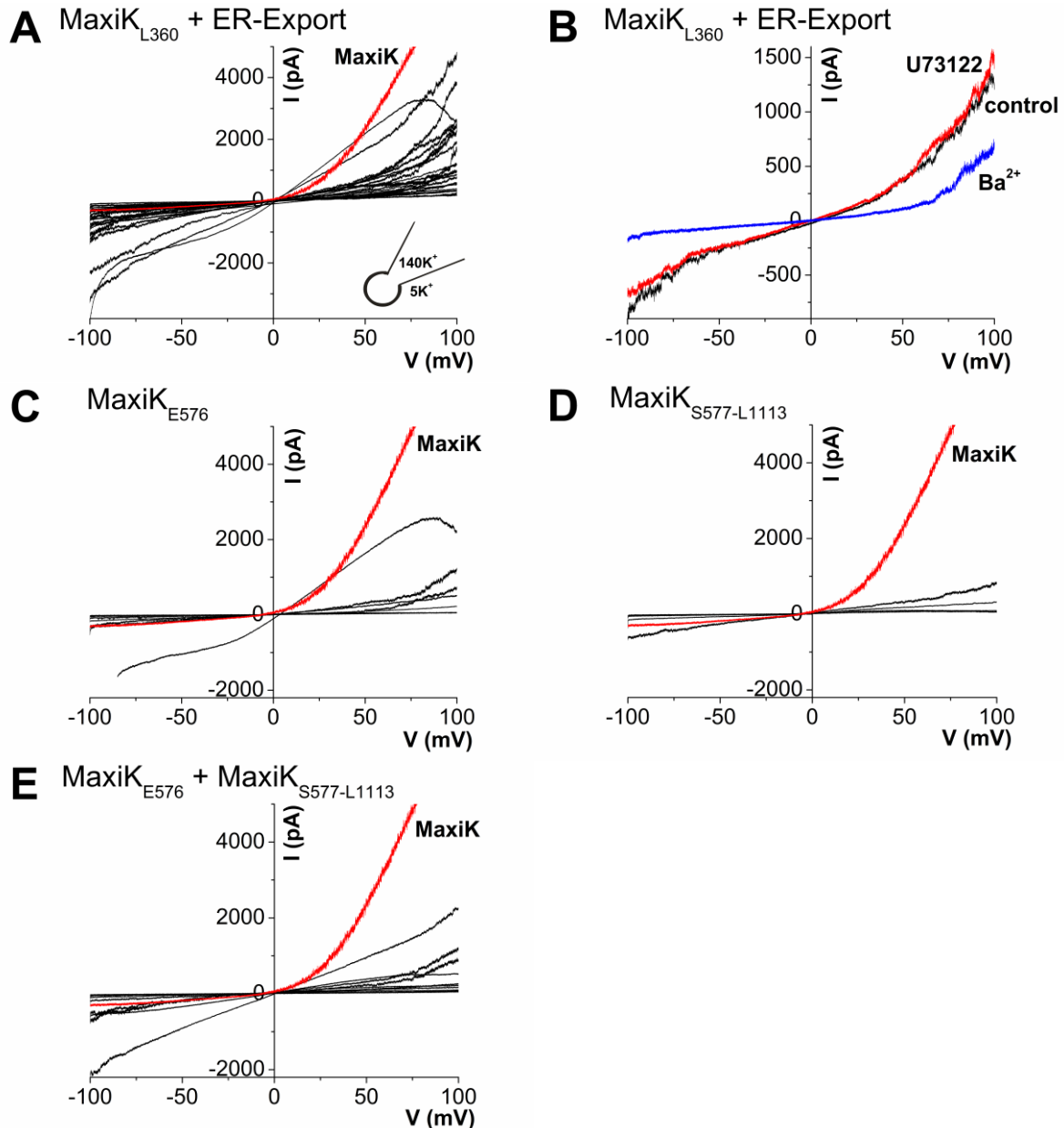


Abbildung 3.22. Messungen an verschiedenen MaxiK-Konstrukten.

Die Whole-Cell-Messungen wurden an HEK-Zellen durchgeführt, die mit MaxiK α (rot in A, C - E), MaxiK_{L360}+ER-Export-Sequenz (A+B), MaxiK-Core- (MaxiK_{E576}; C+E) bzw. MaxiK-Tail-Konstrukt (MaxiK_{S577-L1113}; D+E) transfiziert waren. Es wurden jeweils Spannungsrampen von -100 bis +100 mV (20 mV/s) erzeugt.

(A) Der MaxiK_{L360} wurde zusammen mit der ER-Export-Sequenz (DLIFCL) in HEK-Zellen exprimiert und die Rampen mit dem nativen MaxiK (rot) verglichen (n = 26).

(B) Diese Aufnahmen zeigen die Wirkungen von 10 μ M U73122 und 2 mM Ba²⁺ auf den MaxiK_{L360} + ER-Export-Sequenz.

(C), (D), (E) Diese Aufnahmen zeigen Messungen mit Rampen-Protokollen an HEK-Zellen, die mit dem MaxiK-Core- (MaxiK_{E576}; C) bzw. MaxiK-Tail-Konstrukt (MaxiK_{S577-L1113}; D) transfiziert waren. In Abbildung E wurden beide Konstrukte gemeinsam exprimiert. Die Ströme wurden jeweils mit einer Rampe des nativen MaxiK (rot) verglichen (Core n = 11, Tail n = 4, Core+Tail n = 10).

Wie schon in der Literatur beschrieben (Wei et al., 1994), erhielt man - genau wie bei den Versuchen zuvor - Kanäle, die in Stromgröße und Stromverlauf deutlich vom nativen MaxiK unterscheidbar sind.

Als nächstes wurden die beiden Regionen zusammen exprimiert (Abbildung 3.22E). Aber auch hier zeigte keine Zelle einen deutlichen auswärts-gleichrichtenden Strom, der dem MaxiK ähnelt.

Dies kann zwei Gründe haben. Erstens haben die Arbeitsgruppen, die die Core- und Tail-Region co-exprimiert haben (Meera et al., 1997; Schreiber et al., 1999; Schmalhofer et al., 2005), die Trennung zwischen den zwei Regionen deutlich weiter distal - innerhalb des Linkers zwischen S8 und S9 - gelegt (652, 687 bzw. 675). Diese Stelle ist allerdings für meine Versuche uninteressant, da dann die beiden zum GIRK homologen Regionen in der Core-Region liegen und sich nicht auf zwei getrennten Konstrukten befinden.

Ein zweiter möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte darin bestehen, dass die beiden Regionen nur einen funktionellen MaxiK bilden, wenn sie in Oozyten exprimiert werden, die Wei et al. (1994) und Meera et al. (1997) verwendet haben, nicht aber in HEK-Zellen wie in diesen Versuchen.

3.4 Untersuchung von mutierten IRK- und GIRK-Kanälen im heterologen Expressionssystem

3.4.1 Untersuchung des Kir2.1(L222I)

IRK (Kir2.1) und ROMK (Kir1.1) sind eng mit GIRK (Kir3.1/3.2) verwandt. Trotzdem blockierten U73122 und U73343 nur GIRK und zeigten keine Wirkung auf IRK oder ROMK (siehe Abschnitte 3.2.4 und 3.2.5). Diese auffällig unterschiedliche Wirkung könnte evtl. auf eine Interaktion von U73122 mit der PIP₂-Bindungsstelle hindeuten - wie ursprünglich von Cho et al. (2001) vorgeschlagen.

Um die unterschiedliche Wirkung von U73122 auf die Kanäle zu erklären, könnte man sich vorstellen, dass U73122 sowohl beim ROMK als auch beim IRK nicht in der Lage ist, PIP₂ zu verdrängen, weil beide Kanäle eine sehr hohe Affinität für PIP₂ haben (siehe Abschnitt 1.2.1). Im Gegensatz dazu könnte U73122 PIP₂ am GIRK, der eine niedrige PIP₂-Affinität hat, ersetzen, wodurch der Strom abnehmen würde.

Um zu untersuchen, ob U73122 tatsächlich auf diese Art wirkt, wurden in dieser Arbeit als nächstes mutierte IRK- (Kir2.1-) und GIRK- (Kir3.1/3.2-) Kanäle mit inversen PIP₂-Affinitäten untersucht.

Mehrere Veröffentlichungen der letzten Jahre berichten, dass eine Punktmutation die Affinität für PIP_2 deutlich verändern kann (Zhang et al., 1999; Zhou et al., 2001a). Zhang et al. (1999) haben als erste im proximalen C-Terminus Aminosäuren gefunden, die für die verschiedenen PIP_2 -Sensitivitäten innerhalb der Kir-Familie verantwortlich sein sollen. Mutiert man beim IRK1 an Position 222 Leucin zu Isoleucin, so wird die normalerweise starke PIP_2 -Bindung gelockert (Kir2.1(L222I); Zhang et al., 1999; Du et al., 2004).

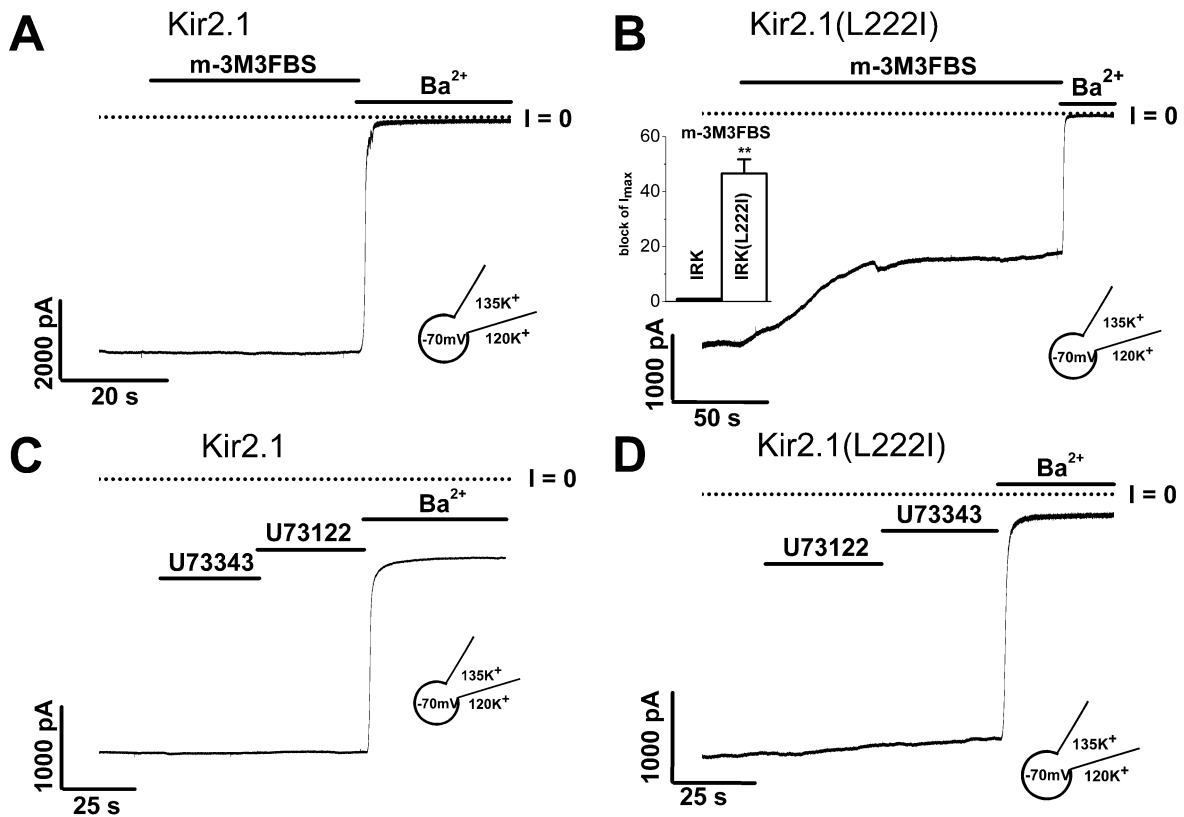


Abbildung 3.23. Wirkung von U73122, U73343 und m-3M3FBS auf Kir2.1_{wildtyp}- und Kir2.1(L222I)-Kanäle.

Die Whole-Cell-Messungen wurden an HEK293-Zellen, die mit Kir2.1_{wildtyp} (A, C) bzw. Kir2.1(L222I) (B, D) transfiziert waren, bei einem konstanten Haltepotential von -70 mV durchgeführt.

(A), (B) Diese Aufnahmen zeigen Messungen an einem nativen Kir2.1_{wildtyp} (A) und am Kir2.1(L222I) (B). Es wurden der PLC-Aktivator m-3M3FBS (50 μM) und als Kontrolle 2 mM Ba^{2+} in die Badlösung appliziert ($n = 6$). Das Inset in (B) zeigt ein Histogramm, das die Hemmung des maximalen Stroms durch m-3M3FBS ($n = 3$) zusammenfasst. ** $p < 0.01$

(C), (D) Es wurden Messungen an einem nativen Kir2.1_{wildtyp} (C, identisch mit Abb. 3.9A) und am Kir2.1(L222I) (D) durchgeführt. 10 μM U73343, 10 μM U73122 und als Kontrolle 2 mM Ba^{2+} wurden in die Badlösung appliziert (Kir2.1_{wildtyp}: U73122 $n = 7$, U73343 $n = 14$; Kir2.1(L222I): U73122 $n = 5$, U73343 $n = 4$).

Die Abbildungen 3.23A-D zeigen Messungen an HEK-Zellen, die transient mit dem Kir2.1_{wildtyp} (Abbildungen 3.23A+C) bzw. mit dem mutierten Kir2.1(L222I) (Abbildungen 3.23B+D) transfiziert waren. Um zu überprüfen, ob die IRK-Mutante tatsächlich eine niedrigere PIP_2 -Affinität als der Kir2.1_{wildtyp} hat, wurde die Wirkung des PLC-Aktivators

m-3M3FBS (2,4,6-Trimethyl-N-(m-3-trifluoromethylphenyl) benzenesulfonamide; Bae et al., 2003) auf die Ströme von Kir2.1_{wildtyp} und Kir2.1(L222I) verglichen. m-3M3FBS wurde von Bae et al. (2003) in einer großen Screening-Studie in humanen Neutrophilen entdeckt. Es aktiviert die PLCs verschiedener Klassen (wie β , γ oder δ) in vitro ohne Isoform-Spezifität. Dabei war es die erste Substanz, die die PLC direkt und nicht über die G_q -Einheit aktiviert.

Da PIP_2 sehr fest an den nativen IRK gebunden ist, dürfte der PLC-Aktivator den Kanal nicht hemmen. Genau dieses Ergebnis zeigt Abbildung 3.23A. Es wurden 50 μM m-3M3FBS appliziert, wodurch es zu keiner Stromreduktion kam. Die gleiche Messung wurde nun an einer HEK-Zelle durchgeführt, die mit dem mutierten Kir2.1(L222I) transfiziert war. Gab man hier 50 μM m-3M3FBS, so reduzierte sich der Strom ca. um die Hälfte (Abbildung 3.23B). In dieser Messung kann man gut die Charakteristika der Stromhemmung durch den PLC-Aktivator m-3M3FBS erkennen: Zum einen benötigte die Stromreduktion deutlich länger als z.B. durch Ba^{2+} oder U73122. In dieser Messung dauerte es etwa 100 s bis zur vollständigen Wirkung. Zum anderen war der Zeitverlauf der Stromreduktion nicht gleichmäßig. Etwas Ähnliches haben auch Horowitz et al. (2005) beschrieben. Sie haben festgestellt, dass m-3M3FBS tatsächlich die PLC aktiviert, allerdings mit einer Verzögerung und einem irregulären Zeitverlauf (Horowitz et al., 2005). In einigen Experimenten stoppt die Stromreduktion plötzlich, um nach einiger Zeit wieder neu zu beginnen.

Das Inset in Abbildung 3.23B zeigt eine Auswertung dieser Messungen. Während m-3M3FBS auf die nativen Kir2.1 keine Wirkung zeigte, reduzierte es den Strom der Kir2.1(L222I) im Durchschnitt um $46,5 \pm 5,2 \%$ ($n = 6$, $p < 0.02$).

Im Gegensatz dazu blieben U73122 und U73343 ohne Wirkung auf die mutierten Kir2.1(L222I) (Abbildung 3.23D). Offensichtlich wirken U73122 und U73343 beim Kir2.1 nicht über diese PIP_2 -Bindungsstelle.

3.4.2 Wirkung des PLC-Aktivators m-3M3FBS auf GIRK und MaxiK

Horowitz et al. (2005) haben vorgeschlagen, dass die Stromreduktion, die U73122 verursacht, unter bestimmten Bedingungen durch eine schwache Aktivierung der PLC (ca. 3 - 4%) verursacht sein könnte. Durch diese PLC-Aktivierung werden die PIP_2 -Level in der Membran erniedrigt, wodurch es dann zu der Reduktion des Stroms kommt.

Wenn U73122 tatsächlich als partieller PLC-Aktivator wirkt, dann müsste seine Wirkung mit der eines anderen PLC-Aktivators vergleichbar sein. Deshalb wurde als nächstes die

Wirkung des PLC-Aktivators m-3M3FBS (siehe Abschnitt 3.4.1) auf den GIRK untersucht.

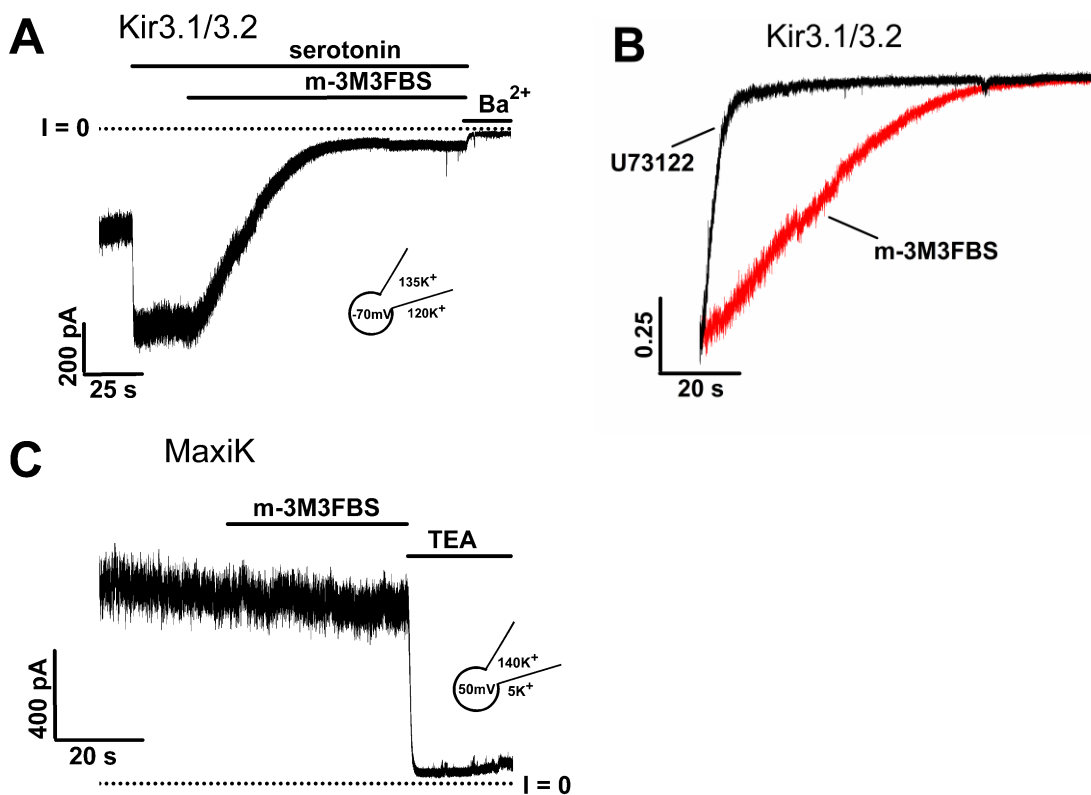


Abbildung 3.24. Wirkung des PLC-Aktivators m-3M3FBS auf GIRK- (Kir3.1/3.2) und MaxiK-Kanäle.

Die Whole-Cell-Messungen wurden an HEK293-Zellen, die mit Kir3.1/3.2 und dem 5HT_{1A}-Rezeptor (A, B) bzw. der MaxiK α -Untereinheit (C) transfiziert waren, durchgeführt.

(A) Diese Aufnahme zeigt eine Messung von GIRK bei konstantem Haltepotential von -70 mV. Nach Aktivierung der GIRK-Ströme durch 20 μ M Serotonin wurden 50 μ M m-3M3FBS und als Kontrolle 2 mM Ba²⁺ appliziert (n = 5).

(B) Diese Grafik zeigt zwei typische Messungen, die zum besseren Vergleich auf Ausgangs- und Endstrom normiert wurden. Dabei werden die unterschiedlichen Zeitverläufe der Stromreduktion durch U73122 und m-3M3FBS verglichen (n = 5).

(C) Diese Aufnahme zeigt eine Messung von MaxiK bei einem konstanten Haltepotential von 50 mV. Es wurden 50 μ M m-3M3FBS und als Kontrolle 10 mM TEA appliziert (n = 7).

Die Abbildung 3.24A zeigt eine typische Whole-Cell-Messung von HEK-Zellen, die transient mit dem Kir3.1/3.2 und dem 5HT_{1A}-Rezeptor transfiziert waren. Nach Aktivierung durch Serotonin wurden 50 μ M m-3M3FBS appliziert. Der Strom nahm um ca. 85% ab. Dieses Ergebnis konnte durchaus erwartet werden, weil GIRK eine vergleichbar niedrige Affinität für PIP₂ haben (siehe Abschnitte 1.2.1 und 3.4.1). Durch die Aktivierung der PLC durch m-3M3FBS wird PIP₂ vermindert, und der Strom nimmt ab.

Allerdings gab es einen deutlichen Unterschied zwischen dem Block durch U73122 und dem Block durch m-3M3FBS. In Abbildung 3.24B sind die Zeitverläufe von zwei typischen Messungen dargestellt, zum einen die blockierende Wirkung von U73122 und zum anderen von m-3M3FBS - beide zum besseren Vergleich auf Ausgangs- und Endstrom normiert. Dabei erkennt man, dass die Stromreduktion durch m-3M3FBS deutlich länger dauert als durch U73122. Die Zeitkonstante des m-3M3FBS-Blockes war etwa 10-fach langsamer. Die deutlich schnellere Kinetik von U73122 macht einen GIRK-Block durch PLC-Aktivierung unwahrscheinlich und deutet eher auf eine direkte Wirkung hin (vergleiche mit Horowitz et al., 2005).

Die PLC kann über die Bildung von IP_3 regulatorische Effekte auf die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle ausüben, wobei das Ca^{2+} wiederum Wirkung auf die Aktivität des MaxiK hat. Da U73122 den MaxiK stärker hemmt als U73343 sollte ausgeschlossen werden, dass dies einer allmählichen Erschöpfung der PIP_2 -Level durch Aktivierung der PLC zuzuschreiben ist. Deshalb wurde als nächstes die Wirkung des PLC-Aktivators m-3M3FBS auf den MaxiK getestet. Dabei können Effekte über den Ca^{2+} -Signalweg ausgeschlossen werden, da bei Whole-Cell-Messungen die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration mit der Pipettenlösung fixiert ist. Die Abbildung 3.24C zeigt eine typische Messung an HEK-Zellen, die mit dem MaxiK transfiziert waren. Unter diesen Bedingungen verursachte 50 μ M m-3M3FBS keine wahrnehmbare Stromreduktion.

Unter diesen Messbedingungen scheinen PLC und PIP_2 keine Rolle in der Regulation der MaxiK-Kanäle zu spielen. Zusammen mit der Ca^{2+} -Pufferung scheint auch eine Wirkung von U73122 über die PLC-abhängige Kaskade eher unwahrscheinlich.

3.4.3 Untersuchung des Kir3.1/3.2(I232L)

Um - entsprechend den vorherigen Versuchen - die PIP_2 -Affinität des GIRK zu erhöhen, wurde beim Kir3.2 das Isoleucin an Position 232 gegen Leucin ausgetauscht und anschließend der mutierte Kanal zusammen mit dem Kir3.1_{wildtyp} und dem Serotonin-Rezeptor transient transfiziert.

Diese Punktmutation soll die normalerweise lockere PIP_2 -Bindung des GIRK verstärken, so dass PIP_2 alleine ausreicht, um den Kanal zu aktivieren (Zhang et al., 1999; Zhou et al., 2001a; Du et al., 2004). Dadurch sollte der GIRK also stärker konstitutiv aktiv sein. Aus diesem Grund ist der Serotonin-Rezeptor eigentlich nicht mehr nötig, weil der Kanal schon ohne Aktivierung über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor aktiv sein soll. Trotzdem wurde er als Kontrolle mit transfiziert.

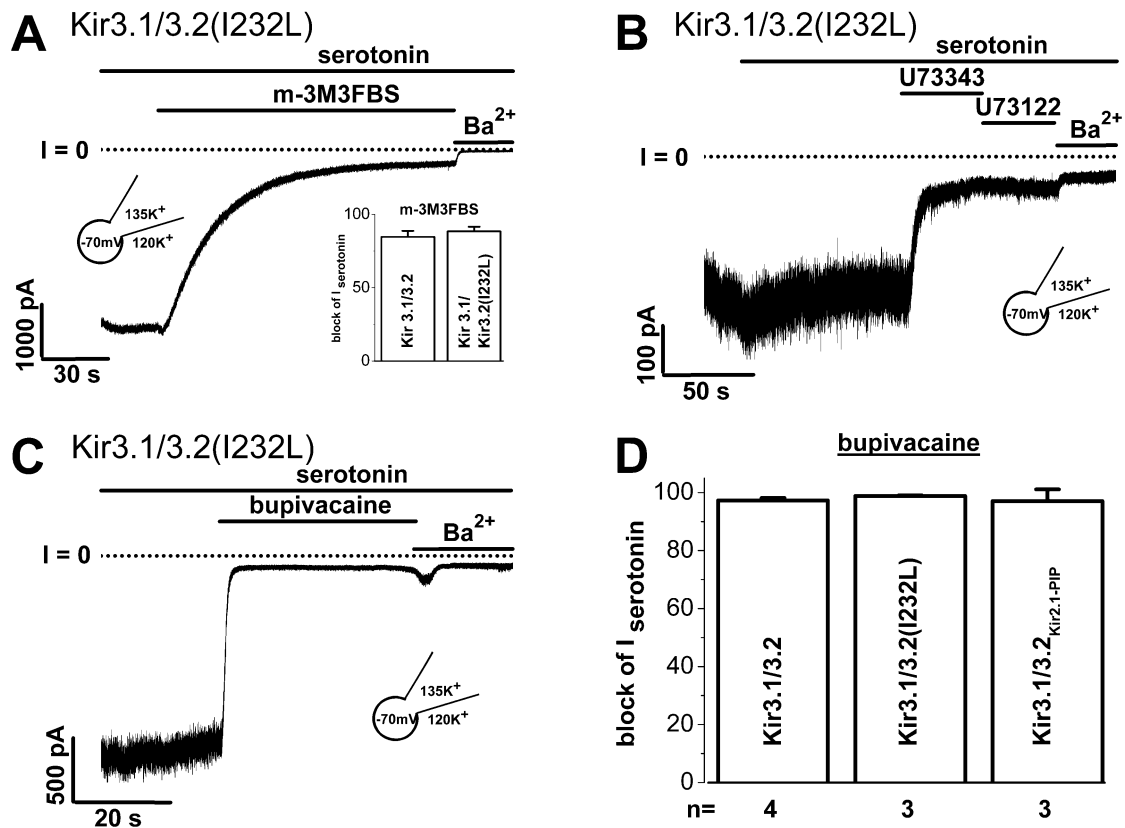


Abbildung 3.25. Wirkung von m-3M3FBS, U73122, U73343 und Bupivacain auf den Kir3.1/3.2(I232L)-Kanal.

Die Whole-Cell-Messungen wurden an HEK293-Zellen, die mit dem Kir3.1/3.2(I232L) transfiziert waren, bei einem konstanten Haltepotential von -70 mV durchgeführt.

(A), (B), (C) Nach Aktivierung des Kanals durch 20 μ M Serotonin wurden der PLC-Aktivator m-3M3FBS (50 μ M) (A), U73343 und U73122 (jeweils 10 μ M; B) bzw. Bupivacain (1000 μ M; C) in die Badlösung appliziert. Als Kontrolle wurden jeweils 2 mM Ba²⁺ gegeben. Das Inset in (A) zeigt ein Histogramm, das die Wirkung von 50 μ M m-3M3FBS auf den maximalen Strom nach Aktivierung durch Serotonin von Kir3.1/3.2 und Kir3.1/3.2(I232L) zusammenfasst (n = 5).

(D) Dieses Histogramm zeigt eine Zusammenfassung von Messungen wie in (C). Am nativen Kir3.1/3.2, Kir3.1/3.2(I232L) und Kir3.1/3.2_{Kir2.1-PIP} (siehe Abschnitt 3.4.4) wird die Wirkung von 1000 μ M Bupivacain, normalisiert auf den Strom nach Aktivierung durch Serotonin, dargestellt. Die Anzahl der Messungen ist jeweils unter den Balken angegeben.

Die Abbildungen 3.25A-C zeigen typische Messungen von HEK-Zellen, transfiziert mit dem mutierten Kir3.2(I232L), zusammen mit Kir3.1_{wildtyp} und dem 5HT_{1A}-Rezeptor. In Abbildung 3.25A sieht man den Effekt des PLC-Aktivators m-3M3FBS (50 μ M). Durch die festere PIP₂-Bindung des mutierten GIRK sollte der PLC-Aktivator eine geringere Wirkung haben als auf den GIRK_{wildtyp}. Allerdings wurden beide Kanäle im gleichen Maß blockiert (Abbildung 3.24A, 3.25A), wie auch die Auswertung im Inset in Abbildung 3.25A bestätigt. Dies wirft die Frage auf, ob die Punktmutation alleine ausreicht, um die Affinität von PIP₂ am GIRK entscheidend zu verändern. Dieser Verdacht wird bestätigt durch die Serotonin-Antwort, die ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zeigt (Abbildung 3.26B).

Vergleicht man die Wirkung von U73122 bzw. U73343 auf den GIRK_{wildtyp} und den

Kir3.1/3.2(I232L), so lässt sich ebenfalls kein Unterschied in der Wirkung feststellen (Abbildung 3.25B, 3.26C). Angesichts der fraglichen Änderung der PIP₂-Affinität ist die Aussagekraft dieses Versuchs allerdings erheblich eingeschränkt.

Zhou et al. (2001a) haben die Wirkung von Bupivacain auf den GIRK untersucht. Dies ist interessant, weil das Lokalanästhetikum Bupivacain als einzige Substanz die gleiche Selektivität hinsichtlich der Blockade von ROMK, IRK, GIRK und MaxiK besitzt wie U73122 (siehe Abschnitt 3.2.10). Dabei berichten Zhou et al. (2001a), dass mutierte GIRK, die die hohe PIP₂-Affinität des IRK besitzen, deutlich weniger durch Bupivacain gehemmt werden, weil das Lokalanästhetikum über eine Antagonisierung der PIP₂-GIRK-Interaktion wirken soll.

Um dies zu überprüfen wurde der Kir3.1/3.2(I232L) auf die Wirkung von Bupivacain getestet (Abbildung 3.25C). Allerdings war in diesen Messungen kein signifikanter Unterschied zu der Wirkung am GIRK_{wildtyp} festzustellen (Abbildung 3.25C+D), so dass sich unter meinen Messbedingungen die Ergebnisse von Zhou et al. (2001a) nicht reproduzieren ließen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass - wie oben ausgeführt - bereits die Voraussetzung, nämlich eine erhöhte PIP₂-Affinität, nicht gegeben war.

3.4.4 Untersuchung des Kir3.1/3.2_{Kir2.1-PIP}

Im Gegensatz zu Zhang et al. (1999), die beschrieben haben, dass der Austausch einer Aminosäure (Kir3.1/3.2(I232L)) die PIP₂-Bindung am GIRK genauso verstärkt wie der Austausch der gesamten PIP₂-Bindungs-Sequenz, haben Zhou et al. (2001a) festgestellt, dass die PIP₂-Affinität beim Austausch der gesamten PIP₂-Domäne deutlich höher ist als bei der Punktmutation.

Da die Punktmutation beim GIRK (Kir3.1/3.2(I232L)) in dieser Arbeit offensichtlich keine Veränderung der Wirkungen von Serotonin, m-3M3FBS, Bupivacain, U73122 und U73343 bewirkt hat (siehe Abschnitt 3.4.3), sollte als nächstes die Chimäre konstruiert werden, die Zhou et al. (2001a) verwendet haben, um die PIP₂-Affinität noch weiter zu erhöhen.

Es wurde eine Chimäre aus Kir3.1 bzw. Kir3.2 und Kir2.1 konstruiert, bei der im GIRK die Sequenz, die für die PIP₂-Bindung maßgeblich ist (39 Aminosäuren, Kir3.1 (G207-L246), Kir3.2 (G216-L255); Zhang et al., 1999; Zhou et al., 2001a) gegen die homologe Sequenz des IRK1 (K207-L245) ausgetauscht wurde, um GIRK-Kanäle mit einer hohen PIP₂-Affinität zu bilden.

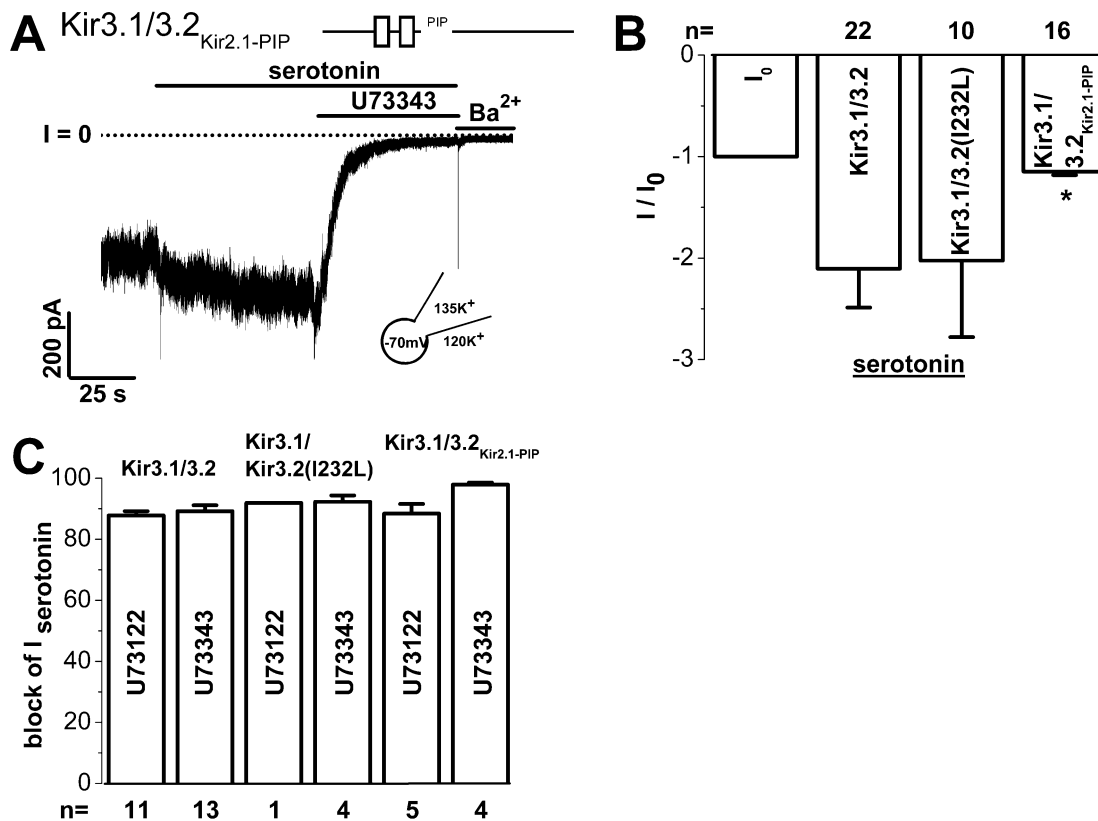


Abbildung 3.26. Wirkung von m-3M3FBS, U73122 und U73343 auf die Kir3.1/3.2_{Kir2.1-PIP}-Chimäre.

Die Whole-Cell-Messungen wurden an HEK293-Zellen, die mit Kir3.1/3.2_{Kir2.1-PIP} transfiziert waren, bei einem konstanten Haltepotential von -70 mV durchgeführt.

(A) Nach Gabe von 20 μ M Serotonin wurden 10 μ M U73343 in die Badlösung appliziert. Als Kontrolle wurde 2 mM Ba²⁺ gegeben.

(B), (C) Die Histogramme zeigen eine Zusammenfassung von Messungen wie in (A) für verschiedene GIRK-Kanäle. Am nativen Kir3.1/3.2, Kir3.1/3.2(I232L) und Kir3.1/3.2_{Kir2.1-PIP} (siehe Abschnitt 3.4.3) wurde die Wirkung von 20 μ M Serotonin (B) und 10 μ M U73122 und U73343 (C) dargestellt. Das Histogramm in (B) ist normalisiert auf den Ausgangsstrom I_0 , das Histogramm in (C) auf den Strom nach Aktivierung durch Serotonin. Die Anzahl der Messungen ist jeweils über bzw. unter den Balken angegeben. * $p < 0.05$

Die Abbildung 3.26A zeigt eine typische Messung am Kir3.1/3.2_{Kir2.1-PIP}. Das Schema rechts oben stellt den Aufbau des gemessenen Kanals dar, wobei der Anteil des Kir2.1 grau markiert ist. Die Punktmutation beim GIRK reichte unter meinen Messbedingungen nicht, um die PIP₂-Bindung zu festigen (siehe Abschnitt 3.4.3). Deshalb war die Serotonin-Antwort genauso groß wie beim GIRK_{wildtyp} (Abbildung 3.26B). Die Chimäre in Abbildung 3.26A zeigt dagegen große Basalströme, die durch Serotonin kaum erhöht werden konnten. Dies bestätigt auch die Auswertung in Abbildung 3.26B. Danach ist durch Serotonin nur eine minimale Stromerhöhung im Vergleich zum Ausgangsstrom I_0 möglich. Das spricht dafür, dass die Chimäre dank einer erhöhten PIP₂-Bindungs-Affinität eine deutlich erhöhte konstitutive Kanalaktivität besitzt.

Trotzdem zeigten U73122 und U73343 die gleiche Wirkung wie auf den $\text{GIRK}_{\text{wildtyp}}$ und die Punktmutation (Abbildung 3.26A+E). Diese Daten lassen darauf schließen, dass U73122 und U73343 das Schaltverhalten nicht durch eine Interaktion mit der PIP_2 -Bindungsstelle beeinflusst haben.

3.4.5 Untersuchung des $\text{Kir3.1}_{\text{G431}}$ und der Chimären Kir3-Kir2.1 und Kir2.1-Kir3

Die bisherigen Mutationen konnten sowohl am MaxiK als auch am GIRK keinen Aufschluss darüber geben, an welcher Stelle U73122 / U73343 angreifen. Wahrscheinlich interferieren sie mit dem C-Terminus, aber nicht mit der PIP_2 -Bindungsstelle (siehe Abschnitt 3.4.4). Sieht man sich das Alignment in Abbildung 3.18 an, dann gibt es neben der PIP_2 -Bindungsstelle eine weitere, mehr C-terminal liegende Sequenz beim GIRK, die Ähnlichkeiten mit dem MaxiK aufweist. Diese Sequenz beinhaltet auch eine Bindungsstelle für die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins.

Kir3.1 besitzt einen viel längeren C-Terminus als Kir2.1. Da U73122 nicht auf den Kir2.1 wirkt und Homologien zwischen GIRK und MaxiK C-terminal vom Ende des Kir2.1 liegen, könnte sich die Bindungsstelle für U73122 und U73343 in diesem distalsten C-terminalen Sequenz-Stück befinden.

Damit der GIRK genau mit dem IRK abschließt, wurde der Kir3.1 zunächst an Position 431 trunziert ($\text{Kir3.1}_{\text{G431}}$). Da der Kir3.2 wesentlich kürzer ist als der Kir3.1 wurde er nicht trunziert, sondern als Wildtyp mit dem $\text{Kir3.1}_{\text{G431}}$ co-exprimiert. Das zweite Diagramm in Abbildung 3.27A stellt den schematischen Aufbau des $\text{Kir3.1}_{\text{G431}}$ dar.

Die Abbildung 3.27B zeigt eine typische Messung bei -70 mV an HEK-Zellen, die mit dem $\text{Kir3.1}_{\text{G431}}$, $\text{Kir3.2}_{\text{wildtyp}}$ und dem $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ -Rezeptor transfiziert waren. Zunächst wurde der Kanal durch 20 μM Serotonin aktiviert. Dies war nötig, weil er offensichtlich keine hohe Basal-Aktivität besaß. Die Sequenz im C-Terminus, die innerhalb der Kir-Familie für die unterschiedlichen PIP_2 -Sensitivitäten verantwortlich ist (siehe Abschnitte 3.4.1-4; Zhang et al., 1999) liegt nämlich deutlich weiter proximal, so dass die Deletion keinen Einfluß auf die PIP_2 -Bindung haben sollte. Das Inset zeigt eine Spannungsrampe, die nach Aktivierung durch Serotonin aufgenommen wurde. Im Vergleich zur Rampe eines nativen GIRK (Abbildung 3.5B) zeigte der $\text{Kir3.1}_{\text{G431}}$ etwas weniger Einwärtsgleichrichtung.

Anschließend wurde 10 μM U73343 appliziert. Dabei fiel auf, dass die Stromreduktion deutlich geringer ausfiel als beim $\text{GIRK}_{\text{wildtyp}}$ (Abbildung 3.5A). Dieses Ergebnis bestätigt

auch die Auswertung der Messungen im Histogramm in Abbildung 3.27E. Während U73122 und U73343 den Strom des GIRK_{wildtyp} um etwa 90% reduzierten, hemmten sie den Kir3.1_{G431}/Kir3.2 nur um 40% (U73122) bzw. 50% (U73343). Betrachtet man die Zeitkonstanten der Stromhemmung durch U73122 bzw. U73343 (Abbildung 3.27F), dann fällt auf, dass die Kinetik des Blocks am trunkierten Kanal signifikant verlangsamt wurde.

Dieser Versuch deutet stark darauf hin, dass tatsächlich Sequenzen im distalen C-Terminus, wahrscheinlich im Bereich der Bindungsstellen für die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins, in die Wirkung von U73122 bzw. U73343 involviert sind. Um dies weiter zu untersuchen, wurden als nächstes Chimären aus Kir3- und Kir2.1-Kanälen konstruiert, die auf den Veröffentlichungen von Huang et al. (1995) und Slesinger et al. (1995) basierten.

Während Huang et al. (1995) herausgefunden haben, dass die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins am GIRK im N-Terminus und im C-Terminus (Aminosäuren 273 - 462) direkt bindet, haben Slesinger et al. (1995) verschiedene Chimäre aus GIRK1 und dem G-Protein-insensitiven IRK1 geschaffen, um genauer herauszufinden, welche Domänen für die G-Protein-Steuerung des GIRK wichtig sind. Dabei entdeckten sie, dass eine Chimäre bei Co-Expression mit $G\beta\gamma$ -Untereinheiten dann aktiviert, wenn sie entweder den N-Terminus oder einen distalen Teil des C-Terminus des GIRK1 enthält.

Die Chimäre Kir3-2.1 enthielt den N-Terminus und die hydrophoben Transmembran-Segmente (M1-H5-M2) des GIRK1 bzw. GIRK2 und den C-Terminus des IRK1 (Kir3.1_{C179_V179}Kir2.1 bzw. Kir3.2_{C188_V179}Kir2.1). Das dritte Diagramm in Abbildung 3.27A zeigt den schematischen Aufbau der Chimäre.

Diese beiden Konstrukte wurden zusammen mit dem 5HT_{1A}-Rezeptor transient in HEK-Zellen exprimiert. Die Abbildung 3.27C zeigt eine typische Messung bei -70 mV. Zunächst wurden 20 μ M Serotonin gegeben, um den Kanal zu aktivieren, da die Chimäre offensichtlich nicht konstitutiv aktiv war. Auch Slesinger et al. (1995) haben eine niedrige Basal-Aktivität dieser Chimäre gesehen, was sie darauf zurückführen, dass die N-terminale Domäne bzw. eine Kombination aus N-Terminus und hydrophober Core-Region die Größe des Basal-Stroms reguliert (Slesinger et al., 1995). Das Inset zeigt eine Spannungsrampe, die nach Aktivierung durch Serotonin aufgenommen wurde. Im Gegensatz zur Rampe des Deletions-Konstruktes Kir3.1_{G431} verstärkte sich die Einwärtsgleichrichtung durch den Austausch des C-Terminus deutlich. Die Chimäre aus Kir3 und Kir2.1 zeigte die starke Einwärtsgleichrichtung, die sowohl für den GIRK als auch für den IRK typisch ist. Dies lässt darauf schließen, dass durch die Kombination der beiden Kanäle keine große Veränderung der Kanalstruktur aufgetreten ist.

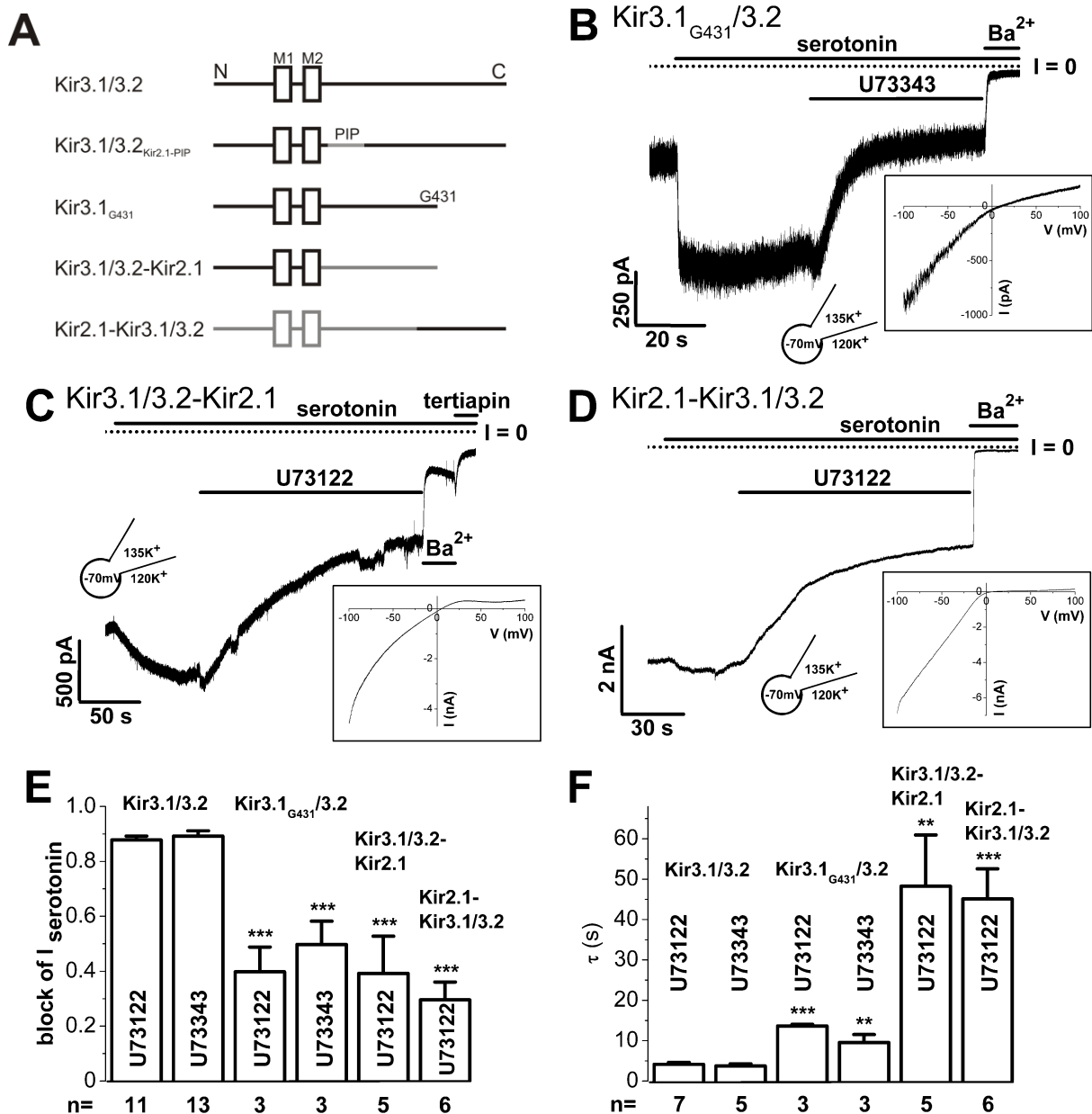


Abbildung 3.27. Wirkung von U73122 und U73343 auf Kir3.1_{G431}/3.2, Kir3.1/3.2-Kir2.1 und Kir2.1-Kir3.1/3.2.

Die Whole-Cell-Messungen wurden an HEK293-Zellen, die mit dem Kir3.1_{G431}/3.2- (B), Kir3.1/3.2-Kir2.1- (C) und Kir2.1-Kir3.1/3.2-Kanal (D) transfiziert waren, bei einem konstanten Haltepotential von -70 mV durchgeführt.

(A) Schematische Darstellung des nativen Kir3.1/3.2-Kanals und der mutierten Kir3/Kir2-Chimären. Schwarz dargestellt ist der Sequenz-Anteil des Kir3.1, grau der des Kir2.1 (N = N-Terminus, C = C-Terminus, M_{1,2} = Transmembran-Helices 1 und 2).

(B), (C), (D) Wirkung von 10 μM U73343 (B) bzw. U73122 (C+D) auf die mutierten Kir3.1_{G431}/3.2- (B), Kir3.1/3.2-Kir2.1- (C) und Kir2.1-Kir3.1/3.2-Kanäle (D). Zunächst wurden die Kanäle durch 20 μM Serotonin aktiviert. Als Kontrolle wurden jeweils 2mM Ba²⁺ und in (C) zusätzlich 60 nM Tertiapin gegeben. Im Inset wird jeweils eine Spannungs-Rampe des entsprechenden Kanals von -100 bis +100mV (100 mV/s) dargestellt.

(E) Das Histogramm zeigt eine Zusammenfassung der Messungen von (B-D) für verschiedene GIRK-Konstrukte. Am nativen Kir3.1/3.2, am Kir3.1_{G431}/3.2, und an den Chimären Kir3.1/3.2-Kir2.1 und Kir2.1-Kir3.1/3.2 wurde die blockierende Wirkung von 10 μM U73122 und U73343 dargestellt. Das Histogramm wurde normalisiert auf den Strom nach Aktivierung durch Serotonin.

(F) Dieses Histogramm zeigt die Zeitkonstanten des Blocks von U73122 und U73343 am nativen Kir3.1/3.2, am Kir3.1_{G431}/3.2, und an den Chimären Kir3.1/3.2-Kir2.1 und Kir2.1-Kir3.1/3.2. Die Anzahl der Messungen ist jeweils unter den Balken angegeben (E+F). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Gab man bei den Messungen der Chimäre aus Kir3-Kir2.1 10 μ M U73122, so fielen deutlich zwei Unterschiede zur Blockade des GIRK_{wildtyp} auf (vergleiche auch mit Abbildung 3.5A). Zum einen war die Stromreduktion deutlich geringer. Im Gegensatz zum GIRK_{wildtyp}, den U73122 um etwa 90% hemmte, reduzierte es den Strom der Chimäre nur um 39%, wie die Auswertung im Histogramm in Abbildung 3.27E bestätigt. Noch auffälliger war allerdings die Veränderung bei den Zeitkonstanten der Kinetik des Blocks. Im Vergleich zum GIRK_{wildtyp} benötigte U73122 mehr als die 10-fache Zeit, um den Strom zu reduzieren (Abbildung 3.27F). Erwähnenswert ist noch die Tatsache, dass Ba²⁺ (2 mM) nicht den kompletten Strom blockieren konnte wie am GIRK_{wildtyp}, sondern dies erst durch Gabe von Tertiapin geschah, obwohl beide Substanzen als Porenblocker wirken. Anscheinend benötigt Ba²⁺ im Vergleich zu Tertiapin weitere Sequenzen aus dem C-Terminus, um wirken zu können.

Nachdem die Chimäre aus Kir3-Kir2.1 die Wirkung von U73122 deutlich verändert hat, wurde auch die zweite Chimäre, bei der Slesinger et al. (1995) bei Co-Expression mit G β -Untereinheiten erhöhte Ströme gesehen haben, konstruiert.

Die Chimere Kir2.1-Kir3 bestand aus dem N-Terminus, der hydrophoben Core-Region (M1-H5-M2) und einem großen Teil des C-Terminus des IRK1 und dem distalen Teil des C-Terminus des GIRK1 bzw. GIRK2 (Kir2.1_{Y326_F328}Kir3.1 bzw. Kir2.1_{Y326_T337}Kir3.2). Den schematischen Aufbau der Chimäre zeigt das vierte Diagramm in Abbildung 3.27A.

Die Abbildung 3.27D zeigt eine typische Messung bei -70 mV an HEK-Zellen, die mit diesen beiden Konstrukten und dem 5HT_{1A}-Rezeptor transient transfiziert waren. Bei Gabe von 20 μ M Serotonin kam es zu keiner wesentlichen Stromerhöhung, da die Chimäre konstitutiv aktiv war - genau wie der native IRK1. Auch Slesinger et al. (1995) haben bei dieser Chimäre einen großen Agonisten-unabhängigen Basal-Strom gesehen. Die Rampe im Inset zeigt eine sehr ausgeprägte Einwärtsgleichrichtung, wie sie ebenfalls typisch für den IRK_{wildtyp} ist. Im Gegensatz zum IRK1, bei dem U73122 keine Wirkung zeigte (Abbildung 3.9A), war dieser Kanal aber plötzlich sensitiv für U73122. Bei Gabe von U73122 verhielt sich der Kanal ähnlich wie die andere Chimäre aus Kir3-Kir2.1. Der Strom wurde um etwa 30%, mit deutlich verlangsamer Kinetik, reduziert (Abbildung 3.27E+F).

Die Experimente an den mutierten GIRK in diesem Abschnitt weisen eindeutig darauf hin, dass offensichtlich sowohl Segmente im N-Terminus (Chimäre Kir3-Kir2.1) als auch im C-Terminus (Chimäre Kir2.1-Kir3) in die Wirkung von U73122 / U73343 involviert sind.

4 Diskussion

1990 wurde U73122 als Substanz beschrieben, die selektiv die Phospholipase C hemmt (Bleasdale et al., 1989; Smith et al., 1990). Sie ist heute einer der am meisten verwendeten PLC-Inhibitoren. Pubmed listet über 1500 Paper, in denen U73122 im Abstract erwähnt wird. Von den meisten wird U73122 als Schnelltest auf die Beteiligung der PLC an G-Proteingekoppelten Signalwegen benutzt (Lei et al., 2001; Nam et al., 2007; Zhou et al., 2008), aber auch um die verschiedenen Facetten der PIP₂-assoziierten Signalwege zu untersuchen, einschließlich der Ca²⁺-Freisetzung aus IP₃-sensitiven Ca²⁺-Speichern, der DAG-vermittelten Aktivierung der PKC und der PIP₂-abhängigen Regulation von Ionenkanälen. Häufig wird das strukturell verwandte U73343 als Negativ-Kontrolle genutzt, weil ihm die PLC-inhibitorische Wirkung fehlt (Smith et al., 1990).

Allerdings berichteten in den letzten Jahren mehrere Studien, dass U73122 nicht nur auf die PLC wirkt - wie man ursprünglich angenommen hat - sondern auch unspezifische Nebenwirkungen besitzt. So hemmen beide Substanzen ebenfalls die Rezeptor-vermittelte Phospholipase D-Aktivierung (Bosch et al., 1998), und zwar in der Signalkaskade unterhalb der PLC. Außerdem wurden weitere unspezifische Nebenwirkungen von U73122 beschrieben, wie die Interferenz mit der G-Protein-Signalübertragung verschiedener Neurotransmitter-Rezeptoren, z.B. dem Adenosin A₁-Rezeptor (Walker et al., 1998) und dem Histamin H₁-Rezeptor (Hughes et al., 2000) - in der gleichen Konzentration wie es als PLC-Inhibitor wirken soll. Vickers (1993) beschreibt, dass U73122 in Thrombozyten nur scheinbar die PLC hemmt. So soll U73122 (15 µM) die Resynthese von PIP und PIP₂ durch PI- und PIP-Kinasen um 50% reduzieren, wodurch sich die Substrat-Verfügbarkeit der PLC verringern und es zur offensichtlichen Reduzierung ihrer Aktivität kommen würde. Weiterhin soll U73122 auch Lipid-Phosphatasen stimulieren.

Mehrere Arbeitsgruppen haben sich mit dem Einfluss von U73122 und U73343 auf den Ca²⁺-Stoffwechsel verschiedener Zellen beschäftigt. Jin et al. (1994) waren die ersten, die in Neuroblastom- und Ganglienzellen herausfanden, dass es neben einer PLC-inhibitorischen Wirkung von U71322 auch zu einem langsamen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration aus den intrazellulären Speichern in Ca²⁺-freier Badlösung kommt. Weitere Arbeitsgruppen bestätigen, dass U73122 direkt Ionenkanäle öffnen und die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern fördern kann, u. a. Mogami et al. (1997) an Parietalzellen und Muto et al. (1997) an pankreatischen Azinuszellen. Eine mögliche Ursache dafür ist eine hemmende Wirkung auf die Ca²⁺-ATPase der intrazellulären Speicher, wodurch diese Speicher langsam entleert werden (Mogami et al., 1997). Außerdem soll U73343 als Protonophore wirken können (Muto et al., 1997).

In neuerer Zeit haben v. a. zwei Arbeitsgruppen die Wirkung von U73122 und U73343 auf Ionenkanäle untersucht. Cho et al. (2001) haben beschrieben, dass beide Substanzen einen durch Acetylcholin aktivierten K^+ -Strom (K_{ACh}) unabhängig von der PLC hemmen - in Konzentrationen, die denen der PLC-Inhibition entsprechen. Sie konnten im Gegensatz zu früheren Studien (Walker et al., 1998; Hughes et al., 2000) zeigen, dass U73122 nicht mit der G-Protein-Signalübertragung interferiert, sondern auch Kanäle hemmt, die durch $GTP\gamma S$ oder Na^+ aktiviert sind, also unabhängig von der G-Protein-Aktivierung unter Umgehung des GPCR. Cho et al. (2001) schlagen vor, dass U73122 und U73343 den K_{ACh} hemmen, indem sie die Interaktion des Kanals mit PIP_2 antagonisieren, wodurch der Kanalstrom abnimmt.

Horowitz et al. (2005) haben die Wirkung von U73122 auf den M-Strom, der durch $K_{v7.x}$ (KCNQ2 / KCNQ3) erzeugt wird, untersucht. Dabei haben sie sowohl die Hemmung der PLC durch U73122 als auch einige der beschriebenen Nebenwirkungen bestätigt. So ist U73122 ein Hemmer der G_q -gekoppelten PLC-Aktivierung, indem es die Kopplung des M_1 -Rezeptors an die PLC blockiert. Gleichzeitig soll U73122 nach einigen Minuten aber auch als direkter PLC-Aktivator wirken (3% der maximalen PLC-Aktivität). Außerdem kommt es auch zu einer langsamen Abnahme des KCNQ2 / KCNQ3-Stroms, einem langsamen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und einer Abnahme der PIP- und PIP_2 -Pools der Zelle. Einige dieser beschriebenen Wirkungen erklären die Autoren damit, dass die hoch lipidlösliche kationische Substanz U73122 evtl. das anionische PIP_2 binden könnte. Außerdem schreiben neben Horowitz et al. (2005) weitere Autoren verschiedene Nebenwirkungen der Alkylierung von Proteinen durch U73122 zu (Jin et al., 1994; Mogami et al., 1997).

Insgesamt stellt sich also ein sehr widersprüchliches und komplexes Bild dar, was die Ergebnisse der verschiedenen Veröffentlichungen bezüglich U73122 betrifft. Die Befunde in dieser Arbeit (siehe v. a. Abschnitt 4.4) können Klarheit bringen in Bezug auf Wirkungsweise und mögliche Bindungsstellen von U73122 und U73343.

4.1 Direkte Wirkung von U73122 auf GIRK und MaxiK

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass U73122 GIRK- (Kir3.1/3.2) und MaxiK-Kanäle unabhängig von der PLC hemmt.

Zunächst habe ich Versuche an Baclofen-evozierten GIRK-Strömen von dissoziierten Pyramidenzellen von Ratten durchgeführt. Dabei blockierte U73122 in einer Konzentration, die auch für die PLC-Hemmung benutzt wird (10 μM), den Strom zu über 70% (siehe Abschnitt 3.1.1). An heterolog exprimierten GIRK- (Kir3.1/3.2-) Kanälen (co-transfiziert mit dem $5HT_{1A}$ -Rezeptor), die durch Serotonin aktiviert wurden, ließ sich diese Strom-

reduzierende Wirkung bestätigen (siehe Abschnitt 3.2.2). Dieser Effekt resultiert nicht aus einer PLC-Hemmung, da nach heutigem Wissen weder Baclofen (über GABA_B-Rezeptor) noch Serotonin (über 5-HT_{1A}-Rezeptor) über den G_q-gekoppelten PLC-abhängigen Signalweg wirken. Außerdem würde man von einer PLC-Inhibition durch erhöhte PIP₂-Level eine Stromzunahme (siehe Abschnitte 1.1, 1.2.2) und keine Stromreduzierung erwarten. Zweitens zeigte das PLC-inaktive Analogon U73343 die gleiche, bzw. an den Pyramidenzellen sogar eine stärkere inhibitorische Wirkung auf den GIRK als U73122 (siehe Abschnitte 3.1.1, 3.2.2). NCDC (2-nitro-4-carboxyphenyl N,N-diphenylcarbamate) - der erste bekannte PLC-Inhibitor (Walenga et al., 1980) - der aber aus einer anderen molekularen Klasse als U73122 stammt, zeigte keine Wirkung auf den neuronalen GIRK (siehe Abschnitt 3.1.1).

Auch der MaxiK wurde auf eine ähnliche Weise durch U73122 / U73343 mit vergleichbarer Kinetik fast komplett blockiert (siehe Abschnitt 3.2.8). Die halb-maximalen inhibitorischen Konzentrationen (IC₅₀) von U73122 und U73343 am GIRK betragen 0,54 µM bzw. 0,55 µM (siehe Abschnitt 3.2.2). Die gemessene IC₅₀ an den GIRK-Kanälen der dissoziierten Pyramidenzellen stimmte für U73343 mit den heterolog gemessenen Kir3.1/3.2 überein (0,37 µM an den pyramidalen GIRK, siehe Abschnitt 3.1.1). Für U73122 gab es allerdings einen Unterschied (3,89 µM an den pyramidalen GIRK). Diese Differenz lässt sich evtl. mit einer anderen Komposition der GIRK-Untereinheiten in den Pyramidenzellen bzw. alternativem Splicing erklären. Die IC₅₀ von U73122 und U73343 am MaxiK betragen 2,25 µM bzw. 19,28 µM (siehe Abschnitt 3.2.10). Während die Wirkung von U73122 beim MaxiK in der gleichen Größenordnung wie beim GIRK lag, waren die Unterschiede bei U73343 relativ groß. Da beide Substanzen den MaxiK-Strom deutlich hemmten, kann man auch am MaxiK von einer PLC-unabhängigen Wirkung ausgehen (siehe Abschnitt 3.2.8).

Mit dieser Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch der MaxiK durch U73122 / U73343 gehemmt wird.

Die Daten dieser Arbeit erweitern die Liste der unerwünschten PLC-unabhängigen Nebenwirkungen von U73122 in der Literatur. Sie bedeuten, dass sich U73122 nicht dafür eignet, um die Rolle PLC-abhängiger Signalwege bei der Regulation von GIRK und MaxiK zu untersuchen.

4.2 Wirkung von U73122 als Porenblocker

U73122 und U73343 haben PLC-unabhängig den Strom von MaxiK und GIRK gehemmt (siehe Abschnitte 3.1.1, 3.2.2, 3.2.8). Dabei stellt sich die Frage, in welchem Bereich der Kanäle die Bindungsstelle der beiden Substanzen liegen könnte.

U73122 und U73343 könnten als Porenblocker wirken, d.h. die Permeation der K^+ -Ionen oberhalb, im oder unterhalb des Selektivitätsfilters blockieren. Vergleicht man aber die beiden Kanäle, dann unterscheidet sich die Pore des MaxiK durch ihre große Leitfähigkeit deutlich von der des GIRK. Außerdem besteht ein unterschiedliches pharmakologisches Profil von Porenblockern für die beiden Kanäle. Die Kir-Familie wird durch Kationen wie Cs^+ oder Ba^{2+} geblockt, während MaxiK mit nanomolarer Affinität durch Scorpiontoxine wie Charybdotoxin oder Iberiotoxin geblockt werden, wobei Charybdotoxin und TEA wahrscheinlich ähnliche Stellen am äußeren Mund des Kanals besetzen (Hille, 2001). Ba^{2+} hat dagegen eine deutlich schwächere Wirkung auf den MaxiK als auf den GIRK (siehe Abschnitt 3.2.9; Hille, 2001). Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der beiden Kanäle im Porenbereich (siehe Alignment in Abbildung 3.18), so unterscheiden sie sich ebenfalls deutlich bis auf den P-Loop mit der Konsensus-Sequenz -TXXTXGYG-, die als K^+ -Kanal-„Signatursequenz“ bezeichnet wird und für alle K^+ -Kanäle gleich ist (Heginbotham et al., 1992).

In diesem Zusammenhang ist Tertiapin, ein kurzes Peptid aus dem Gift der Honigbiene (Xu & Nelson, 1993) interessant, weil es laut Literatur ein ähnliches pharmakologisches Profil wie U73122 / U73343 besitzt. Es wurde als hoch potenter und sehr selektiver Porenblocker der GIRK-Kanäle (Kir3.1/3.2- und Kir3.1/3.4-Heteromultimere) eingeführt, der keine Wirkung auf die IRK-Kanäle zeigt (Jin & Lu, 1998; Kitamura et al., 2000). Damit ist es - ähnlich wie U73122 und U73343 - in der Lage, zwischen den beiden Typen der Kir-Familie zu unterscheiden. Kanjhan et al. (2005) haben zusätzlich festgestellt, dass Tertiapin auch MaxiK-Kanäle hemmt. Der Wirkmechanismus am GIRK ist bisher nicht vollständig geklärt, aber man stellt sich vor, dass es die Kanalpore blockiert, indem es mit seiner α -Helix das äußere Kanal-Vestibulum verstopft (Jin et al., 1999).

Auch wenn das pharmakologische Profil von Tertiapin mit dem von U73122 übereinzustimmen scheint, so gibt es doch einige deutliche Unterschiede. Erstens ist Tertiapin - anders als U73122 - ein gleichermaßen potenter Blocker von ROMK (Jin & Lu, 1998). Zweitens scheinen die Mechanismen der Hemmung bei den verschiedenen Kanälen unterschiedlich zu sein. Beim GIRK ist die Stromhemmung schnell, spannungsunabhängig und zeigt keine Erholung (siehe Abschnitt 3.2.2; Kitamura et al., 2000), während die

Hemmung des ROMK bis zu 10 min dauern kann und reversibel ist (Sackin et al., 2003). Im Gegensatz dazu zeigt die Blockade der MaxiK eine sog. „use- und voltage-dependence“. So müssen die Kanäle für eine maximale Hemmung mindestens 15 min kontinuierlich durch starke Depolarisationen stimuliert werden. Der relativ langsame Block von MaxiK durch Tertiapin erscheint offensichtlich nur, wenn die Pore des Kanals komplett offen ist („open channel block“; Kanjhan et al., 2005). Wenn dagegen die Messbedingungen verwendet wurden, die eine zuverlässige Blockade der MaxiK durch U73122 und U73343 erkennen ließen (physiologischer K^+ -Gradient, $V_h = 0$ mV), zeigte Tertiapin keine hemmende Wirkung auf den MaxiK (siehe Abschnitt 3.2.9).

Ein weiterer Grund, der gegen die Wirkung von U73122 als Porenblocker spricht, besteht in der Ladung der verschiedenen Substanzen. Während die typischen Porenblocker positiv geladen sind, um in die Pore zu gelangen, sind U73122 und U73343 ungeladen. Möglich wäre daher ein Blockmechanismus wie der der Lokalanästhetika, die ebenfalls die Pore blockieren und von denen es auch ungeladene Substanzen gibt. Allerdings wirkte Bupivacain als typisches Lokalanästhetikum durch eine Rechtsverschiebung der Aktivierungskurve des MaxiK, während U73122 eine Linksverschiebung verursachte (siehe Abschnitte 3.2.10, 3.2.11, 4.4.2).

Sieht man sich die Kanäle der Kir-Familie an, dann fällt auf, dass sich die Kanäle besonders im Bereich der Pore sehr ähneln (siehe Alignment in Abbildung 3.18). Dies spricht dagegen, dass U73122 als möglicher Porenblocker ausschließlich auf den GIRK wirkt. Außerdem ließ sich beim IRK nur durch Austausch des distalen C-Terminus bei erhaltener Pore eine Empfindlichkeit für U73122 herstellen (siehe Abschnitte 3.4.5, 4.4.6), was ebenfalls gegen eine Wirkung in der Pore spricht.

Wenn man all diese Unterschiede berücksichtigt, erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass U73122 und U73343 den GIRK und MaxiK durch direkten Block im Bereich der Pore hemmen.

4.3 Wirkung von U73122 auf Cystein-Gruppen

Ein weiterer möglicher Angriffspunkt für U73122 könnten Cystein-Gruppen sein. Verschiedene Nebenwirkungen von U73122 wurden der Alkylierung von Proteinen - u. a. sogar der PLC - zugeschrieben (Jin et al., 1994; Mogami et al., 1997; Horowitz et al., 2005). Es ist bekannt, dass Cystein-modifizierende Substanzen wie MTSET, MTSES und NEM die Spannungs- und Ca^{2+} - Abhängigkeit u. a. des MaxiK verändern können (Zhang & Horrigan,

2005; Zhang et al., 2006). Beim MaxiK wurden 30 Cystein-Reste identifiziert, wovon die Mehrzahl im C-Terminus lokalisiert ist. Wenn man die Strukturen von U73122 (N-substituiertes Maleimid) und U73343 vergleicht, dann erkennt man als einzigen Unterschied eine Doppelbindung, die U73122 chemisch reaktiv macht (siehe Abschnitt 3.2.9). Eine weitere Substanz, die die gleiche reaktive Gruppe besitzt, ist NEM (N-ethylmaleimid), das zu den Cystein-modifizierenden Substanzen gezählt wird. Durch seine reaktive Gruppe könnte U73122 möglicherweise wie NEM eine Alkylierung von Cystein-Resten verursachen (Horowitz et al., 2005). Im Gegensatz dazu ist U73343 das nicht-reaktive Succinimid-Analogon. Zhang & Horrigan (2005) haben festgestellt, dass NEM den Strom des MaxiK reduziert, indem es auf Cystein-Reste besonders im Bereich von RCK1 und 2 wirkt - aber nur unter bestimmten Versuchsbedingungen. So ist die Wirkung stark Ca^{2+} -abhängig mit einem Gipfel bei einer mittleren Ca^{2+} -Konzentration von 5 μM , während bei einer Konzentration von 0 oder 70 μM Ca^{2+} keine Modifikation mehr stattfindet (Zhang & Horrigan, 2005). Offensichtlich bewirken diese alkylierenden Substanzen komplizierte Veränderungen in der Ca^{2+} - und Spannungsabhängigkeit. Zhang & Horrigan (2005) liefern keine weiteren Erklärungen über diese nicht monotone Ca^{2+} -Abhängigkeit.

Da U73122 den MaxiK stärker hemmt als U73343, könnte ein Teil des Blockes wie bei den anderen Substanzen aus der Alkylierung dieser Cystein-Reste resultieren. Eine Modifikation des Kanalproteins durch eine unspezifische Alkylierungsreaktion durch U73122 kann ich aber als Block-Mechanismus aus drei Gründen ausschließen. Erstens blockierte auch die nicht-alkylierende Substanz U73343 den GIRK und MaxiK. Zweitens zeigte NEM in meinen Messungen trotz einer 5-fach höheren Konzentration als Zhang & Horrigan (2005) sie verwendet haben keine Wirkung auf den MaxiK, wenn man die Versuchsbedingungen anwendete, die eine zuverlässige Blockade durch U73122 und U73343 erkennen ließen (siehe Abschnitt 3.2.9). Drittens verursacht eine Alkylierungsreaktion bei Zhang & Horrigan (2005) durch MTSES bzw. NEM einen Rechts-Shift der Aktivierungskurve, während U73122 in meinen Messungen einen Links-Shift verursachte (siehe Abschnitt 3.2.11).

4.4 Mögliche Bindungsstellen von U73122

Obwohl GIRK und MaxiK zu verschiedenen Ionenkanal-Familien gehören und strukturell und funktionell sehr unterschiedlich sind, wurden sie beide durch U73122 und U73343 gehemmt. GIRK gehören zur Familie der einwärts-gleichrichtenden K^+ -Kanäle, bestehen aus zwei TM-Domänen und werden über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor aktiviert (siehe Abschnitt 1.2.1), während der MaxiK ein spannungsgesteuerter Kanal ist, der durch Spannung und Ca^{2+} aktiviert wird und aus 7 TM-Domänen besteht (siehe Abschnitt 1.2.4).

Gleichzeitig waren die beiden Substanzen aber auch in der Lage, zwischen eng verwandten Kanälen einer Familie zu differenzieren. So zeigten sie keine Wirkung auf weitere Kanäle der Kir-Familie wie den ROMK (siehe Abschnitt 3.2.4) oder den IRK (siehe Abschnitt 3.2.5). Dies ist bemerkenswert, da die meisten K^+ -Kanal-Blocker nicht spezifisch für eine Art von K^+ -Kanälen sind, und gerade der IRK und der GIRK im Bereich der Pore fast identisch sind (Cho et al., 2001). Auch auf den IK1, einen weiteren Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanal, zeigten beide Substanzen keine Wirkung (siehe Abschnitt 3.2.7). In Bezug auf weitere K^+ -Kanal-Familien zeigten die Substanzen weder Wirkung auf die Familie der spannungsabhängigen K_v -Kanäle - getestet an dissoziierten Pyramidenzellen (siehe Abschnitt 3.1.2) - noch auf die KCNQ-Kanäle (heterolog exprimierte KCNQ1 / E1 bzw. KCNQ2 / KCNQ3; siehe Abschnitt 3.2.6). Cho et al. (2001) konnten ebenfalls keine Wirkung auf Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle feststellen.

Die wahrscheinlichste Erklärung für diese hohe Selektivität von U73122 und U73343 ist eine homologe Stelle am GIRK und MaxiK, über die die Substanzen wirken können. Dafür kommen mehrere mögliche Bindungsstellen in Frage.

Um diese homologen Regionen der beiden Kanäle herauszufinden, habe ich ein Alignment ihrer Aminosäuresequenzen erstellt (Abbildung 3.18). Dabei fielen erstaunliche Übereinstimmungen in den C-Termini der beiden Kanäle auf. Die C-Termini von GIRK und MaxiK sind bekannt dafür, dass sie multiple Regulationsdomänen besitzen, die Angriffspunkte verschiedener Effektoren sein können, um so das Kanal-Schalten zu regulieren (Meera et al., 1997; Lu et al., 2006; Salkoff, 2006; Logothetis et al., 2007b). Die Sequenz-Ähnlichkeiten liegen dabei in Bereichen, die für die Modulation der jeweiligen Kanäle entscheidend sind. Beim GIRK liegen sie im Bereich der Bindungsstellen von PIP_2 bzw. der Bindungsstelle für die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins. Beim MaxiK liegen sie im Bereich der sog. „Regulator of Conductance for K^+ “ (RCK)1 -Domäne, was S7 und S8 entspricht bzw. dem Linker zwischen RCK1 und RCK2 (zwischen S8 und S9). Nach dem Alignment ist es naheliegend, die Bindungsstelle für U73122 in diesen Bereichen zu suchen (rot bzw. blau markiert in Abbildung 3.19).

4.4.1 Wirkung von U73122 auf die Ca^{2+} -Bindungsstellen des MaxiK

Betrachtet man das Alignment von MaxiK und GIRK, dann fallen auch Gemeinsamkeiten auf, die im Bereich der Ca^{2+} -Bindungsstellen des MaxiK liegen (Abbildungen 3.18 und 3.19). Es könnte also sein, dass U73122 mit diesen Ca^{2+} -Sensor-Domänen interagiert.

Allerdings konnte in meinen Messungen diese Vermutung widerlegt werden, da die hemmende Wirkung von U73122 in maximaler und in nominell Ca^{2+} -freier Lösung gleich blieb (siehe Abschnitt 3.2.11). Außerdem ist bisher keine direkte Ca^{2+} -Abhängigkeit des GIRK bekannt. All dies deutet darauf hin, dass der Block durch U73122 / U73343 Ca^{2+} -unabhängig ist.

4.4.2 Wirkung von Bupivacain auf den MaxiK

Sucht man nach Substanzen, die ein ähnliches Wirkprofil auf die Kanäle der Kir-Familie haben wie U73122 und U73343, so stößt man auf das Lokalanästhetikum Bupivacain. Bupivacain blockt ebenfalls selektiv den GIRK-Strom in micromolaren Dosen, indem es die PIP_2 -Kanal-Interaktion antagonisieren soll (Zhou et al., 2001a). Dagegen zeigt es keine Wirkung auf ROMK und IRK (Zhou et al., 2001a). Deshalb stellt sich die Frage, ob es auch eine Interaktion mit dem MaxiK-Kanal gibt.

Tatsächlich konnte ich zum ersten Mal in einer Studie zeigen, dass auch MaxiK ein Angriffsziel von Bupivacain sind. Deutet die erstaunliche Überschneidung in der Kanalselektivität auf einen gemeinsamen Wirkmechanismus von Bupivacain und U73122 hin? Dagegen spricht, dass Bupivacain - im Gegensatz zu U73122 - MaxiK durch eine Rechtsverschiebung der Aktivierungskurve hemmt (siehe Abschnitte 3.2.10 und 3.2.11) - ein Mechanismus, der übrigens für die Wirkung von Lokalanästhetika charakteristisch ist (z.B. Meeder & Ulbricht, 1987).

4.4.3 Wirkung von U73122 über die PIP_2 -Bindungsstelle

Cho et al. (2001) haben an K_{Ach} -Kanälen festgestellt, dass der Block durch U73122 in der Signalkaskade unterhalb der Wirkung von $\text{G}\beta\gamma$ und Na^+ stattfindet, da die Substanz den Kanal auch nach direkter Aktivierung durch $\text{GTP}\gamma\text{S}$ bzw. G-Protein-unabhängiger Aktivierung durch Na^+ hemmt. Daher folgern sie, dass U73122 mit der PIP_2 -GIRK-Interaktion interferiert und so den Kanal blockiert (Cho et al., 2001).

Alle Kir-Kanäle haben unterschiedliche Affinitäten für PIP_2 (siehe Abschnitte 1.2.1, 3.4.1-4; Rohacs et al., 2003; Du et al., 2004), wobei die Stärke der Kanal- PIP_2 -Interaktion die Sensitivität der Kir-Kanäle für die Regulation durch die verschiedenen Modulatoren bestimmt

(Rapedius et al., 2007; Du et al., 2004). ROMK und IRK haben eine sehr hohe Affinität für PIP_2 und sind deshalb konstitutiv aktiviert (Zhang et al., 1999). Aus diesem Grund können sie kaum moduliert werden und werden durch PLC-Aktivierung im physiologischen Bereich auch nicht wesentlich gehemmt. GIRK dagegen haben eine niedrige Affinität für PIP_2 und sind daher vorwiegend geschlossen in unstimulierten Zellen, da PIP_2 wegen der schwachen Interaktion nicht in der Lage ist, den Kanal zu aktivieren (Rohacs et al., 1999; Huang et al., 1998; Zhang et al., 1999; Du et al., 2004). Diese Kanäle sind aber sehr sensitiv für Modulation. Es werden Substanzen wie $\text{G}\beta\gamma$ oder Na^+ benötigt, die die Interaktion von PIP_2 mit dem Kanal stabilisieren, um den Kanal dann zu aktivieren (Xiao et al., 2003). Allerdings können sie aber wiederum schon durch geringe Aktivierung der PLC mit nachfolgender PIP_2 -Hydrolyse gehemmt werden.

Die unterschiedliche Wirkung von U73122 auf die Kanäle könnte daher darauf beruhen, dass sowohl ROMK als auch IRK eine so hohe Affinität für PIP_2 haben, dass U73122 nicht in der Lage ist, PIP_2 zu verdrängen. Im Gegensatz dazu könnte U73122 am GIRK durch die niedrige PIP_2 -Affinität die PIP_2 -Bindungsstelle blockieren, wodurch der Strom abnehmen würde. Auf diese Weise würde U73122 einen Block des GIRK verursachen.

Horowitz et al. (2005) erklären einige der Nebenwirkungen von U73122 ebenfalls durch eine Wirkung über PIP_2 . Allerdings soll U73122 nicht die PIP_2 -Kanal-Interaktion antagonisieren, sondern als hoch lipidlösliche kationische Substanz evtl. das anionische PIP_2 binden.

Um zu untersuchen, ob U73122 tatsächlich die PIP_2 -GIRK-Interaktion antagonisiert, wurden in dieser Arbeit mutierte Kir2.1- und Kir3.1/3.2-Kanäle mit inversen PIP_2 -Affinitäten untersucht. Mehrere Veröffentlichungen der letzten Jahre berichten, dass eine Punktmutation die Affinität für PIP_2 deutlich verändern kann (Zhang et al., 1999; Zhou et al., 2001a). Zhang et al. (1999) haben als erste im proximalen C-Terminus Aminosäuren gefunden, die für die verschiedenen PIP_2 -Sensitivitäten innerhalb der Kir-Familie verantwortlich sein sollen. Mutiert man beim IRK1 an Position 222 Leucin zu Isoleucin (grün dargestellt im Alignment in Abbildung 4.1; Kir2.1(L222I)), so wird die normalerweise starke PIP_2 -Bindung gelockert (Zhang et al., 1999; Du et al., 2004). Mutiert man dagegen an der analogen Stelle des GIRK2 (Position 232) das vorhandene Isoleucin zu Leucin, soll die normalerweise lockerere PIP_2 -Bindung verstärkt werden, so dass PIP_2 alleine ausreicht, um den Kanal zu aktivieren (Kir3.2(I232L); Zhang et al., 1999; Zhou et al., 2001a; Du et al., 2004). Der Kanal sollte also eher konstitutiv aktiv sein und damit weniger angewiesen auf Modulatoren wie z.B. $\text{G}\beta\gamma$. Trotzdem war an beiden Punktmutationen kein Unterschied in der Wirkung von U73122 festzustellen (siehe Abschnitte 3.4.1, 3.4.3).

4.4.4 Wirkung von Bupivacain über die PIP₂-Bindungsstelle

Zhou et al. (2001a) berichten, dass der Block von GIRK durch Bupivacain PIP₂-abhängig ist, indem das Lokalanästhetikum die PIP₂-GIRK-Interaktion antagonisiert. Daher sollen Kanäle mit hoher PIP₂-Affinität wie IRK und ROMK resistent gegenüber Bupivacain sein. Passend dazu sollen mutierte GIRK, die die hohe PIP₂-Affinität des IRK besitzen, deutlich weniger durch Bupivacain gehemmt werden (siehe Abschnitt 3.4.4; Zhou et al., 2001a).

Um dies zu überprüfen, wurden die im vorherigen Abschnitt vorgestellten Mutanten mit veränderter PIP₂-Affinität auch auf die Wirkung von Bupivacain getestet (siehe Abschnitt 4.4.3). In diesen Messungen war allerdings keine veränderte Wirkung von Bupivacain auf die mutierten Kanäle festzustellen, weder auf die Punktmutation (Kir3.1/3.2(I232L)) noch auf die Chimäre (Kir3.1/3.2_{Kir2.1-PIP}; siehe Abschnitt 3.4.3). Worauf die Diskrepanz zu den Befunden von Zhou et al. (2001a) beruht, lässt sich im Rahmen dieser Arbeit nicht klären.

4.4.5 Wirkung von U73122 auf C-terminal-trunkierte MaxiK

GIRK und noch mehr MaxiK zeigen multiple Regulationsdomänen zwischen ihren letzten Transmembran-Domänen (M2 bzw. S6) und ihrem C-terminalen Ende, die großen Einfluss auf das Schaltverhalten der Kanäle besitzen (Meera et al., 1997; Lu et al., 2006; Salkoff et al., 2006; Logothetis et al., 2007b). Das Alignment in Abbildung 3.18 zeigt erstaunliche Homologien der beiden Kanäle in diesen zytoplasmatischen C-Termini, besonders in Bereichen, die für die Modulation der jeweiligen Kanäle entscheidend sind. Beim GIRK liegen sie im Bereich der Bindungsstellen von PIP₂ bzw. Gβγ und beim MaxiK im Bereich der RCK1-Domäne bzw. dem Linker zwischen RCK1 und RCK2. Nach dem Alignment ist es nahe liegend, die Bindungsstelle für U73122 in diesen Bereichen zu suchen.

Um die Hypothese zu testen, dass U73122 an eine dieser Regionen bindet, um die Kanal-Aktivität zu hemmen, erzeugte ich C-terminale Deletions-Konstrukte des MaxiK. Diese Experimente basieren auf einer heute kontroversen Studie von Piskorowski & Aldrich (2002), die eine komplette Deletion des C-Terminus des MaxiK durchgeführt haben. Dabei berichteten sie von fast unveränderten elektrophysiologischen Eigenschaften zum Wildtyp, wie z. B. einer identischen Ca²⁺-Sensitivität. Der einzige Unterschied bestand in einer kürzeren Offenzeit in Einzelkanal-Messungen und einer etwas geringeren Expression (Piskorowski & Aldrich, 2002). Deshalb untersuchte ich mehrere MaxiK-Konstrukte, die an verschiedenen Positionen entlang des C-Terminus trunkiert waren, entsprechend den grünen Balken in Abbildung 3.18.

Im Gegensatz zu Piskorowski & Aldrich (2002) gelangten diese MaxiK-Konstrukte in meinen Versuchen offensichtlich nicht in die Zellmembran, sondern verblieben in Kernmembran und Zytoplasma (ER; siehe Abschnitt 3.3). Daher wurde an alle Konstrukte die ER-Export-Sequenz (= „DLIFCL“) - die von Kwon & Guggino (2004) entdeckt wurde - angehängt, um die Oberflächen-Expression zu erhöhen. Trotzdem ergab keines der Konstrukte funktionelle MaxiK-Kanäle, sondern unspezifische und variable Ströme, die keine auswärts-gerichteten Eigenschaften besaßen.

Tabelle 4.1 Vergleich meiner Daten (schwarz) mit denen von Schmalhofer et al. (2005; rot).

In den Daten aus meiner Arbeit wurden die Oberflächenexpression mit GFP-getagten MaxiK-Konstrukten am konfokalen Mikroskop und die Ströme mit elektrophysiologischen Messungen untersucht. Schmalhofer et al. (2005) untersuchten die Oberflächenexpression mit einer Immun-Fluoreszenzfärbung, die Ströme mit der Patch-Clamp-Methode und die Tetramerisierung mit Western-blots (nicht gezeigt).

MaxiK-Deletions-Konstrukte	Oberflächen-expression	„Normale“ MaxiK - Ströme	„Atypische“ Ströme	Tetramerisierung
I322	-	-	-	
I322 + ER-Sequenz	+	-	+	
I323	-	-	-	-
L360 + ER-Sequenz	+	-	+	
K343	+	-	-	+
A435 + ER-Sequenz	+	-	+	
I441	+	-	-	+
E576 + ER-Sequenz	+	-	+	
G651	-	-	-	+

Die Daten der Messungen an den trunkierten MaxiK (siehe Abschnitt 3.3) stimmen weitgehend mit einer Studie von Schmalhofer et al. (2005) überein, von der ich allerdings erst nach Durchführung meiner Versuche Kenntnis bekam. Schmalhofer et al. (2005) haben verschiedene trunkierte MaxiK-Konstrukte auf Oberflächen-Expression, Tetramerisierung und Bildung normaler elektrophysiologischer MaxiK-Ströme untersucht. Die einzelnen Ergebnisse von Schmalhofer et al. (2005), verglichen mit den Ergebnissen dieser Arbeit, sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Ihre Daten zeigen, dass sich die Domänen, die für Kanal-Tetramerisierung, Interaktion mit der β_1 -Untereinheit und Oberflächen-Expression notwendig sind, in einem Bereich befinden, der aus S0-S6 und dem Linker zwischen S6 und RCK1 (= die ersten 343 Reste des Proteins) besteht. Die beiden RCK-Domänen (Reste 344-1113) sind nicht nötig für diese Funktionen, spielen aber eine kritische Rolle in der Regulation des

Trafficking und der Funktion der Konstrukte. So zeigen alle Konstrukte von Schmalhofer et al. (2005), die ähnliche Deletionsstellen wie ich gewählt haben (BK_{I323}, BK_{K343}, BK_{I441} und BK_{G651}), ebenfalls keine elektrophysiologischen Ströme, die Ähnlichkeit mit einem MaxiK besitzen. Schmalhofer et al. (2005) vermuten, dass die Ströme, die Piskorowski & Aldrich (2002) in ihrer Studie gesehen haben, endogenen MaxiK-Kanälen aus den Expressionszellen zugeordnet werden müssen und nicht einer Expression der trunkierten MaxiK_{I323}.

4.4.6 Wirkung von U73122 über die G $\beta\gamma$ -Bindungsstelle des GIRK

Angesichts der Unmöglichkeit, funktionelle MaxiK-Mutanten zu generieren, habe ich mich darauf verlegt, anhand von GIRK / IRK-Mutanten gemeinsame Angriffspunkte von U73122 und U73343 zu identifizieren. Wahrscheinlich interferieren die beiden Substanzen mit dem C-Terminus, aber nicht mit der PIP₂-Bindungsstelle (siehe Abschnitt 4.4.3). Wenn man sich das Alignment in Abbildung 3.18 ansieht, dann gibt es aber neben der eher im proximalen C-Terminus gelegenen PIP₂-Bindungsstelle eine weitere, mehr C-terminal liegende Sequenz beim GIRK, die Ähnlichkeiten mit dem MaxiK aufweist. Da der Kir3.1 einen längeren C-Terminus als der Kir2.1 besitzt und diese Gemeinsamkeiten zwischen GIRK und MaxiK C-terminal vom Ende des Kir2.1 auftreten, könnte die Bindungsstelle für U73122 und U73343 in diesem distalsten C-terminalen Sequenz-Stück liegen. Dieser Bereich beinhaltet beim GIRK auch eine Bindungsstelle für die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins.

Damit der GIRK genau mit dem IRK abschließt, wurde er an Position 431 trunkiert (Kir3.1_{G431}). Tatsächlich fiel die Stromreduktion durch U73122 bzw. U73343 deutlich geringer aus als beim GIRK_{wildtyp}. Außerdem war die Kinetik des Blocks am trunkierten Kanal verlangsamt (siehe Abschnitt 3.4.5).

Um die Hypothese, dass tatsächlich Sequenzen im distalen C-Terminus in die Wirkung von U73122 / U73343 involviert sind, weiter zu untersuchen, wurden als nächstes Chimären aus Kir3 und Kir2 auf die Wirkung der beiden Substanzen untersucht. Diese Chimären basieren auf Veröffentlichungen von Huang et al. (1995) und Slesinger et al. (1995).

Huang et al. (1995) haben durch biochemische Versuche herausgefunden, dass die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins am GIRK in zwei separaten Bereichen direkt bindet, und zwar erstens im N-Terminus und zweitens in einem Bereich aus 190 AS im C-Terminus (Aminosäuren 273 - 462). Diese Domäne entspricht in etwa dem für mich interessanten Bereich distal der PIP₂-Bindungsstelle. Daraufhin haben Slesinger et al. (1995) verschiedene Chimären aus GIRK1 und dem G-Protein-insensitiven IRK1 geschaffen, um genauer

herauszufinden, welche Domänen wichtig für die G-Protein-Steuerung des GIRK sind. Dabei fielen zwei verschiedene Chimären auf, die beide bei Co-Expression mit $G\beta\gamma$ -Untereinheiten erhöhte Ströme aufwiesen, also durch $G\beta\gamma$ aktiviert wurden. Die eine Chimäre enthielt den N-Terminus und die hydrophobe Core-Region des GIRK1 und den C-Terminus des IRK1, und die andere Chimäre bestand aus dem IRK1 und enthielt den distalen C-Terminus des GIRK1. Offensichtlich wird eine Chimäre bei Co-Expression mit $G\beta\gamma$ -Untereinheiten also dann aktiviert, wenn sie entweder den N-Terminus oder einen distalen Teil des C-Terminus des GIRK1 enthält. Die hydrophobe Core-Region des GIRK1 (M1-H5-M2) ist dagegen für die $G\beta\gamma$ -Sensitivität nicht wichtig (Slesinger et al., 1995).

Die blockierende Wirkung von U73122 war in meinen Messungen tatsächlich deutlich abgeschwächt, wenn man den kompletten C-Terminus des GIRK durch den C-Terminus des IRK ersetzte (40% Stromreduktion statt 90% beim GIRK). Außerdem benötigte U73122 bei der Chimäre mehr als zehnmal soviel Zeit, um den Strom zu reduzieren (siehe Abschnitt 3.4.5). Umgekehrt wurde eine IRK-Chimäre, die den distalen Teil des C-Terminus des GIRK erhielt, plötzlich sensitiv für U73122 und U73343 (siehe Abschnitt 3.4.5).

Diese Experimente an den mutierten GIRK weisen eindeutig darauf hin, dass sowohl Segmente im N-Terminus (Chimäre Kir3-Kir2.1) als auch im C-Terminus (Chimäre Kir2.1-Kir3) in die Wirkung von U73122 / U73343 involviert sind. Interessanterweise finden sich auch im Alignment nicht nur im C-Terminus, sondern auch im N-Terminus Gemeinsamkeiten des GIRK mit dem MaxiK (nicht dargestellt in Abbildung 3.18).

Zusammen mit den Erkenntnissen von Slesinger et al. (1995), die Regionen im N-Terminus und im C-Terminus (zwischen H325 und P462) für die $G\beta\gamma$ -Aktivierung verantwortlich machen, deuten diese Ergebnisse stark auf eine Wirkung von U73122 und U73343 über die $G\beta\gamma$ -Bindungsstelle hin.

Die MaxiK-Konstrukte ergaben keine funktionellen Kanäle (siehe Abschnitt 4.4.5), wodurch es nicht möglich war, dort eine Bindungsstelle für U73122 zu identifizieren. Aber aufgrund des Alignments ist es am wahrscheinlichsten, dass auch am MaxiK die beiden Substanzen über eine putative $G\beta\gamma$ -Bindungsstelle im C-Terminus wirken. Tatsächlich gibt es inzwischen neuere Befunde, die auch die MaxiK zur Gruppe von Ionenkanälen zählen, die direkt über $G\beta\gamma$ moduliert werden (Zhou et al., 2008).

4.5 Mechanistische Wirkung von U73122 auf MaxiK und GIRK

U73122 hat auf das Schaltverhalten von MaxiK eine komplexe Wirkung. In Whole-Cell-Messungen reduzierte U73122 die Leitfähigkeit, wie man es für Blocker erwartet. In Einzelkanal-Messungen nahm die Amplitude der Einzelkanalöffnungen bei stärkerer Depolarisation jedoch zu. Dieses scheinbar paradoxe Verhalten lässt sich dadurch erklären, dass U73122 das sog. „Fast-Gating“ des MaxiK aufhebt (siehe Abschnitt 3.2.12). „Fast-Gating“ führt dazu, dass die I-V-Beziehung bei starker Depolarisation eine negative Kennlinie zeigt, d.h. bei zunehmend positiveren Potentialen nimmt der sichtbare Einzelkanal-Strom wieder ab, obgleich die treibende Kraft für den K^+ -Strom weiter steigt. Dieses Phänomen wurde zuvor schon für andere K^+ -Kanäle beschrieben, u. a. für Kir-Kanäle (Proks et al., 2001; Claydon et al., 2003; Xie et al., 2004) oder für den MaxiK (Piskorowski & Aldrich, 2006; Schroeder & Hansen, 2007).

Mechanistisch wird dieses Phänomen dem „sehr schnellen Schalten“ („flickering“) des Selektivitätsfilters zugeschrieben. So werden mit zunehmend positiverem Membranpotential die K^+ -Ionen schneller vom Selektivitätsfilter abgezogen als sie von innen nachströmen können. Dies führt zu einer Ionen-Depletion im Filter mit der Konsequenz, dass die Ionen nicht länger die abstoßenden Kräfte der Carbonylgruppen kompensieren können, so dass der Selektivitätsfilter instabil wird und mit einer hohen Frequenz „flickert“ (Schroeder & Hansen, 2007; 2008). Schröder & Hansen (2009) haben für die Konformationsänderungen im Bereich des Selektivitätsfilters für das „Fast-Gating“ Übergangskonstanten im Bereich von 5 MHz gefunden. Diese hohe Zeitauflösung ist nur mit einer Kombination aus spezieller Messtechnik und speziellen Auswert-Algorithmen erreichbar (Schroeder & Hansen, 2007; 2008; Huth et al., 2006; 2008). Mittels der hier benutzten Messtechnik (10 kHz Filter) und Auswertemethode lässt sich das „Fast-gating“ zeitlich nicht auflösen, stellt sich aber als Reduktion der Stromamplitude dar.

Man kann sich die Wirkung von U73122 demnach so vorstellen, dass durch die Bindung an eine C-terminale Region die Proteinkonformation stabilisiert wird, wodurch ein Zusammenfallen der Pore verhindert wird. Dadurch wird das „Fast-Gating“ aufgehoben und die Kennlinie linearisiert. Bei den Messungen in dieser Arbeit konnten Veränderungen der Übergänge im Bereich von 0,1 bis 10 ms bestimmt werden. U73122 bewirkte eine Zunahme der Geschlossen-Zeitkonstanten und eine Abnahme der Offen-Zeitkonstanten (siehe Abschnitt 3.2.12). Diese Übergänge, die von der Geschwindigkeit mehrere Größenordnungen unter der des Selektivitätsfilters liegen, können wahrscheinlich einem anderen Prozess zugeordnet werden - dem Schalten des inneren Gates. Das innere Gate ist ein zytoplasmatischer Verschlussmechanismus für den Ionendurchtritt (Doyle et al., 1998;

Jiang et al., 2002; Kuo et al., 2003). Schröder & Hansen (2009) haben für die langsamen Übergänge Konstanten im Bereich von 1 bis 10 ms beschrieben, die zu den langsamen von mir gemessenen Konstanten passen (siehe Abschnitt 3.2.12). Die schnellen von mir gemessenen Konstanten im Bereich von 0,1 ms (siehe Abschnitt 3.2.12) könnten ebenfalls zum inneren Gate gehören und werden evtl. durch den Tiefpass-Filter (10 kHz) nicht richtig aufgelöst.

Dies bedeutet für die Wirkung von U73122, dass die Blockade des Kanals im Wesentlichen durch ein Schließen des inneren Gates zustande kommt (Abnahme von NP_o). Gleichzeitig wird das Protein stabilisiert, so dass bei massiver Depolarisation kein Flickerblock mehr auftritt. Diese Stabilisierung könnte auch die Verschiebung der Aktivierungskurve nach links (17 mV) erklären (siehe Abschnitt 3.2.11).

Beim GIRK veränderten sich die Offen-Zeitkonstanten nicht, bei den Geschlossen-Zeitkonstanten ergab sich ein ähnliches Bild wie beim MaxiK, zusätzlich kam noch eine Zeitkonstante von 100 ms hinzu. Wie beim MaxiK könnte die Wirkung von U71322 so aussehen, dass über die Bindung im C-Terminus der Kanal im Bereich des inneren Gates blockiert wird.

4.6 Klinische Bedeutung

Angesichts des ungewöhnlichen pharmakologischen Profils von U73343, das selektiv und potent MaxiK- und GIRK-Kanäle hemmt, ohne eine PLC-inhibitorische oder alkylierende Wirkung zu besitzen, stellt sich die Frage, ob die Substanz nicht Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Medikamente sein kann. In der Tat haben Kanjhan et al. (2005) vorgeschlagen, Tertiapin, das ebenfalls MaxiK und GIRK hemmt - wenn auch über einen anderen Mechanismus (s. o.) - für die Behandlung von Entzündung und chronischem Schmerz einzusetzen. Daneben sind weitere therapeutische Anwendungen denkbar. Ein Beispiel ist das sog. GEPD-Syndrom („Generalisierte Epilepsie und Paroxysmale Dyskinesie“). Darunter versteht man die Coexistenz von generalisierter Epilepsie und paroxysmaler Dyskinesie in einem Individuum (Guerrini, 2001; Guerrini et al., 2002). Interiktale EEG-Aufzeichnungen zeigen generalisierte Spike-Wave-Komplexe. Du et al. (2005) konnten als Ursache eine autosomal-dominante Mutation auf Chromosom 10q22 feststellen und zeigen, dass eine Mutation im Gen, das für die α -Untereinheit des MaxiK kodiert (KCNMA1), für das Syndrom verantwortlich ist. Durch eine Substitution eines negativ geladenen Asparaginsäure-Restes gegen einen neutralen Glycin-Rest (D434G) in der

RCK1-Domäne kommt es bei der GEPD zu einer deutlich erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des MaxiK infolge einer 3- bis 5-fach erhöhten Ca^{2+} -Sensitivität. Diese abnorme Funktionssteigerung (Gain-of-function) erlaubt eine schnellere Repolarisation des Aktionspotentials, wodurch pathologische Entladungsmuster entstehen können, die - je nach betroffener Hirnregion - Epilepsien und Bewegungsstörungen hervorrufen können. Deshalb haben Du et al. (2005) Blocker des MaxiK als mögliche Therapie der GEPD vorgeschlagen.

Eine gleichzeitige pharmakologische Hemmung von GIRK-Kanälen sollte gerade bei der GEPD aus folgender Überlegung heraus vorteilhaft sein: GEPD-Patienten zeigen einen Absence-ähnlichen epileptischen Phänotyp. Von Absence-Anfällen weiß man, dass sie durch GABA_B -Rezeptor-Agonisten wie Baclofen verschlimmert werden (Marescaux et al., 1992). Der Grund liegt darin, dass Baclofen über die Aktivierung von GIRK (siehe Abschnitt 3.1.1; Sodickson & Bean, 1996; Sickmann & Alzheimer, 2002) langsame und tiefe inhibitorische postsynaptische Potentiale verstärkt, was einen wesentlichen pathogenetischen Mechanismus für Absencen darstellt. Mit der simultanen Hemmung von MaxiK und GIRK würden also die beiden wesentlichen pathophysiologischen Prozesse des GEPD-Syndroms unterdrückt.

Angesichts der Vielzahl von Krankheiten, die mit Störungen von MaxiK und GIRK assoziiert sind, könnten Substanzen, die sich das von mir hier beschriebene Wirkprinzip zunutze machen, ein vielversprechendes neues Therapiekonzept darstellen.

5. Zusammenfassung

K⁺-Kanäle bilden die größte und heterogenste Gruppe der Ionenkanäle. Sie kommen bei Eukaryoten und Prokaryoten in allen Geweben vor und spielen bei den unterschiedlichsten physiologischen Vorgängen eine wichtige Rolle. Die Sequenzhomologien zwischen verschiedenen α -Untereinheiten der K⁺-Kanäle sind z. T. sehr gering, und auch ihre Regulation unterscheidet sich deutlich.

Trotz dieser Unterschiede konnte ich in dieser Arbeit zeigen, dass zwei K⁺-Kanäle verschiedener Gruppen - der GIRK und der MaxiK - über den gleichen Mechanismus durch die Substanzen U73122 und U73343 blockiert werden. Der GIRK gehört zur Familie der einwärts-gleichrichtenden K⁺-Kanäle (Kir-Familie), besteht aus zwei Transmembran (TM)-Domänen und wird im wesentlichen über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor aktiviert, während der MaxiK ein spannungsgesteuerter Kanal ist, der hauptsächlich durch Spannung und Ca²⁺ aktiviert wird und strukturell zur Gruppe mit 6 Transmembran-Domänen gehört.

U73122 ist eine der am häufigsten verwendeten Substanzen, um Phospholipase C (PLC)-vermittelte Signalwege zu hemmen. Als Kontrolle wird meist das strukturell verwandte, aber nicht PLC-hemmende Analogon U73343 verwendet.

Bei den Messungen fiel eine einzigartige Selektivität von U73122 und U73343 auf, denn weder Kanäle der Kir-Familie (ROMK, IRK) noch ein weiterer Ca²⁺-aktivierter K⁺-Kanal (IK1) wurden durch U73122 gehemmt. Auch auf andere K⁺-Kanäle wie die KCNQ- (heterolog exprimierte KCNQ1/E1 bzw. KCNQ2 / KCNQ3) und weitere spannungsabhängige K_v-Kanäle zeigte U73122 keine Wirkung. Dies ist bemerkenswert, da nur wenige K⁺-Kanal-Blocker spezifisch für bestimmte K⁺-Kanäle sind.

Voruntersuchungen in dieser Arbeit an GIRK-Kanälen dissoziierter Neuronen ergaben Hinweise, dass U73122 GIRK-Kanäle direkt, d.h. auf PLC-unabhängige Weise hemmt.

Die wahrscheinlichste Erklärung für die hohe Selektivität von U73122 und U73343 ist eine homologe Sequenz am GIRK und MaxiK, über die die Substanzen wirken können. Ein Alignment der Aminosäuresequenzen von GIRK und MaxiK zeigte homologe Regionen innerhalb der langen C-terminalen Enden der beiden Kanäle, wodurch die hoch-selektive Wirkung von U73122 und U73343 vermittelt sein könnte. Diese Sequenz-Ähnlichkeiten liegen in Bereichen, die für die Modulation der jeweiligen Kanäle entscheidend sind, beim GIRK im Bereich der Bindungsstelle für die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins, beim MaxiK im Bereich der „Regulator of Conductance for K⁺“ (RCK)- Domänen. Tatsächlich verändern Mutationen in der C-terminalen Region von IRK- und GIRK-Kanälen signifikant ihre Sensitivität für U73122 / U73343.

Meine Ergebnisse deuten stark auf eine Wirkung der beiden Substanzen über die G β γ -Bindungsstelle des GIRK hin. Inzwischen gibt es neuere Befunde, die auch den MaxiK zu den G β γ -regulierten Kanälen zählen, so dass es - auch aufgrund des Alignments - am wahrscheinlichsten ist, dass U73122 auch am MaxiK über eine putative G β γ -Bindungsstelle im C-Terminus wirkt. Hingegen konnte ich in meinen Messungen zeigen, dass U73122 weder als Porenblocker, noch über eine Alkylierung von Cystein-Resten wirkt. Mehrere Studien vermuteten eine Wirkung von U73122 über die Bindungsstelle von Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat (PIP₂). Auch dies konnte ich mit Messungen an mutierten IRK- und GIRK-Kanälen widerlegen.

Eine weitere außergewöhnliche Wirkung von U73122 und U73343 fiel in Einzelkanalmessungen am MaxiK auf. So verlangsamten beide Substanzen das „sehr schnelle Schalten“ („Flickering“) der Kanäle bei starker Depolarisation. Dadurch wurde die I-V-Beziehung, die beim MaxiK normalerweise eine negative Kennlinie zeigt (Abnahme des sichtbaren Einzelkanal-Stroms trotz steigender treibender Kraft bei zunehmender Depolarisation), linearisiert. U73122 schien dabei in der Lage zu sein, die Proteinkonformation des Kanals zu stabilisieren.

In dieser Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass U73122 und U73343 aufgrund ihrer selektiven Wirkung auf GIRK und MaxiK über die Bindung an ein gemeinsames strukturelles Motiv interessante pharmakologische Werkzeuge sind. Neben den entdeckten erstaunlichen Sequenzhomologien zwischen diesen beiden Kanälen konnte eine besondere stabilisierende Wirkung von U73122 auf den MaxiK auf Einzelkanal-Niveau nachgewiesen werden, die das „schnelle Schalten“ des Kanals aufhebt. Aufgrund der direkten Wirkung auf GIRK und MaxiK sollte der Einsatz von U73122 als PLC-Inhibitor, wenn überhaupt, nur unter Vorbehalt erfolgen, insbesondere, wenn elektrophysiologisch relevante Parameter im Vordergrund stehen.

Angesichts dieses ungewöhnlichen Profils von U73122 und U73343 stellt sich die Frage nach der klinischen Relevanz. Tatsächlich gibt es eine Vielzahl von Krankheiten, die mit Störungen von MaxiK und GIRK assoziiert sind, so dass neue Medikamente auf Basis dieser Erkenntnisse eine viel versprechende neue Therapiemöglichkeit darstellen würden. Neben der Behandlung von Entzündung und chronischem Schmerz bietet sich v. a. eine Therapie des sog. GEPD-Syndrom („Generalisierte Epilepsie und Paroxysmale Dyskinesie“) an. Mit der simultanen Hemmung von MaxiK und GIRK könnten wesentliche pathophysiologische Prozesse des GEPD-Syndroms unterdrückt werden.

6. Literaturverzeichnis

Ahluwalia J, Tinker A, Clapp LH, Duchon MR, Abramov AY, Pope S, Nobles M, & Segal AW (2004). The large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel is essential for innate immunity. *Nature* **427**, 853-858.

Alioua A, Mahajan A, Nishimaru K, Zarei MM, Stefani E, & Toro L (2002). Coupling of c-Src to large conductance voltage- and Ca^{2+} -activated K^+ channels as a new mechanism of agonist-induced vasoconstriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14560-14565.

Alvarez J, Montero M, & Garcia-Sancho J (1992). High affinity inhibition of Ca^{2+} -dependent K^+ channels by cytochrome P-450 inhibitors. *J Biol Chem* **267**, 11789-11793.

Andelfinger G, Tapper AR, Welch RC, Vanoye CG, George AL, Jr., & Benson DW (2002). KCNJ2 mutation results in Andersen syndrome with sex-specific cardiac and skeletal muscle phenotypes. *Am J Hum Genet* **71**, 663-668.

Ashcroft FM (2000). *Ion channels and disease* Academic Press, San Diego, CA, USA.

Asteria C (1997). Molecular basis of Bartter's syndrome: new insights into the correlation between genotype and phenotype. *Eur J Endocrinol* **137**, 613-615.

Bae YS, Lee TG, Park JC, Hur JH, Kim Y, Heo K, Kwak JY, Suh PG, & Ryu SH (2003). Identification of a compound that directly stimulates phospholipase C activity. *Mol Pharmacol* **63**, 1043-1050.

Bao L, Rapin AM, Holmstrand EC, & Cox DH (2002). Elimination of the BK(Ca) channel's high-affinity Ca^{2+} sensitivity. *J Gen Physiol* **120**, 173-189.

Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, & Romey G (1996). K(V)LQT1 and Isk (mink) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* **384**, 78-80.

Baukrowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitze S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppersberg JP, & Fakler B (1998). PIP_2 and PIP as determinants for ATP inhibition of KATP channels. *Science* **282**, 1141-1144.

Bayliss DA, Li YW, & Talley EM (1997). Effects of serotonin on caudal raphe neurons: activation of an inwardly rectifying potassium conductance. *J Neurophysiol* **77**, 1349-1361.

Behrens R, Nolting A, Reimann F, Schwarz M, Waldschutz R, & Pongs O (2000). hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family. *FEBS Lett* **474**, 99-106.

Bian S, Favre I, & Moczydlowski E (2001). Ca^{2+} -binding activity of a COOH-terminal fragment of the Drosophila BK channel involved in Ca^{2+} -dependent activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4776-4781.

Bichet D, Haass FA, & Jan LY (2003). Merging functional studies with structures of inward-rectifier K^+ channels. *Nat Rev Neurosci* **4**, 957-967.

Bleasdale JE, Bundy GL, Bunting S, Fitzpatrick FA, Huff RM, Sun FF, & Pike JE (1989). Inhibition of phospholipase C dependent processes by U-73122. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **19**, 590-593.

Boron WF & Boulpaep EL (2005). *Medical Physiology*, updated ed. Elsevier Health Science.

Bosch RR, Patel AM, Van Emst-de Vries SE, Smeets RL, De Pont JJ, & Willems PH (1998). U73122 and U73343 inhibit receptor-mediated phospholipase D activation downstream of phospholipase C in CHO cells. *Eur J Pharmacol* **346**, 345-351.

Braun AP, Fedida D, & Giles WR (1992). Activation of alpha 1-adrenoceptors modulates the inwardly rectifying potassium currents of mammalian atrial myocytes. *Pflugers Arch* **421**, 431-439.

Brenner R, Jegla TJ, Wickenden A, Liu Y, & Aldrich RW (2000a). Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J Biol Chem* **275**, 6453-6461.

Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, & Aldrich RW (2000b). Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* **407**, 870-876.

Brown BS & Yu SP (2000). Modulation and genetic identification of the M channel. *Prog Biophys Mol Biol* **73**, 135-166.

Brown DA, Marrion NV, & Smart TG (1989). On the transduction mechanism for muscarine-induced inhibition of M-current in cultured rat sympathetic neurones. *J Physiol* **413**, 469-488.

Bunemann M, Frank M, & Lohse MJ (2003). G_i protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 16077-16082.

Chanrachakul B, Pipkin FB, & Khan RN (2004). Contribution of coupling between human myometrial beta2-adrenoceptor and the BK(Ca) channel to uterine quiescence. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C1747-C1752.

Chen L, Koh DS, & Hille B (2003). Dynamics of calcium clearance in mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* **52**, 1723-1731.

Cho H, Youm JB, Ryu SY, Earm YE, & Ho WK (2001). Inhibition of acetylcholine-activated K⁺ currents by U73122 is mediated by the inhibition of PIP₂-channel interaction. *Br J Pharmacol* **134**, 1066-1072.

Choe H, Palmer LG, & Sackin H (1999). Structural determinants of gating in inward-rectifier K⁺ channels. *Biophys J* **76**, 1988-2003.

Classen M, Diehl V, & ochsiek K (2004). *Innere Medizin*, 5. ed. Urban & Fischer Verlag, München.

Claydon TW, Makary SY, Dibb KM, & Boyett MR (2003). The selectivity filter may act as the agonist-activated gate in the G protein-activated Kir3.1/Kir3.4 K⁺ channel. *J Biol Chem* **278**, 50654-50663.

Corey S & Clapham DE (1998). Identification of native atrial G-protein-regulated inwardly rectifying K⁺ (GIRK4) channel homomultimers. *J Biol Chem* **273**, 27499-27504.

Cormack BP, Valdivia RH, & Falkow S (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33-38.

Dascal N (1997). Signalling via the G protein-activated K⁺ channels. *Cell Signal* **9**, 551-573.

Dascal N, Schreibmayer W, Lim NF, Wang W, Chavkin C, DiMugno L, Labarca C, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C, Trollinger D, & . (1993). Atrial G protein-activated K⁺ channel: expression cloning and molecular properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10235-10239.

Delmas P & Brown DA (2005). Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nat Rev Neurosci* **6**, 850-862.

Depiereux E, Baudoux G, Briffeuil P, Reginster I, De B, X, Vinals C, & Feytmans E (1997). Match-Box-server: a multiple sequence alignment tool placing emphasis on reliability. *Comput Appl Biosci* **13**, 249-256.

Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, & MacKinnon R (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.

Du W, Bautista JF, Yang H, ez-Sampedro A, You SA, Wang L, Kotagal P, Luders HO, Shi J, Cui J, Richerson GB, & Wang QK (2005). Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder. *Nat Genet* **37**, 733-738.

Du X, Zhang H, Lopes C, Mirshahi T, Rohacs T, & Logothetis DE (2004). Characteristic interactions with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate determine regulation of kir channels by diverse modulators. *J Biol Chem* **279**, 37271-37281.

- Ellgaard L, Molinari M, & Helenius A (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286**, 1882-1888.
- Enkvetchakul D, Loussouarn G, Makhina E, Shyng SL, & Nichols CG (2000). The kinetic and physical basis of K(ATP) channel gating: toward a unified molecular understanding. *Biophys J* **78**, 2334-2348.
- Fakler B, Brandle U, Bond C, Glowatzki E, Konig C, Adelman JP, Zenner HP, & Ruppersberg JP (1994). A structural determinant of differential sensitivity of cloned inward rectifier K⁺ channels to intracellular spermine. *FEBS Lett* **356**, 199-203.
- Fakler B, Brandle U, Glowatzki E, Weidemann S, Zenner HP, & Ruppersberg JP (1995). Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K⁺ channels is caused by intracellular spermine. *Cell* **80**, 149-154.
- Fan Z & Makielski JC (1997). Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem* **272**, 5388-5395.
- Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J, Beckingham K, Chandy KG, Cahalan MD, & Aiyar J (1999). Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J Biol Chem* **274**, 5746-5754.
- Farkas RH, Chien PY, Nakajima S, & Nakajima Y (1997). Neurotensin and dopamine D2 activation oppositely regulate the same K⁺ conductance in rat midbrain dopaminergic neurons. *Neurosci Lett* **231**, 21-24.
- Finley M, Arrabit C, Fowler C, Suen KF, & Slesinger PA (2004). betaL-betaM loop in the C-terminal domain of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels is important for Gβγ subunit activation. *J Physiol* **555**, 643-657.
- Garcia-Calvo M, Knaus HG, McManus OB, Giangiacomo KM, Kaczorowski GJ, & Garcia ML (1994). Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* **269**, 676-682.
- Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, & O'Rourke ST (2006). Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* **110**, 103-116.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, & Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74.
- Grunnet M & Kaufmann WA (2004). Coassembly of big conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and L-type voltage-gated Ca²⁺ channels in rat brain. *J Biol Chem* **279**, 36445-36453.

Guerrini R (2001). Idiopathic epilepsy and paroxysmal dyskinesia. *Epilepsia* **42 Suppl 3**, 36-41.

Guerrini R, Sanchez-Carpintero R, Deonna T, Santucci M, Bhatia KP, Moreno T, Parmeggiani L, & Bernardina BD (2002). Early-onset absence epilepsy and paroxysmal dyskinesia. *Epilepsia* **43**, 1224-1229.

Gurney AM, Osipenko ON, MacMillan D, McFarlane KM, Tate RJ, & Kempf FE (2003). Two-pore domain K channel, TASK-1, in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* **93**, 957-964.

Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, & Wymore RS (2003). International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* **55**, 583-586.

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuehmer W, & Wang X (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 473-508.

Guy-David L & Reuveny E (2007). PIP2--the master key. *Neuron* **55**, 537-538.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, & Sigworth FJ (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85-100.

Hanner M, Schmalhofer WA, Munujos P, Knaus HG, Kaczorowski GJ, & Garcia ML (1997). The beta subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel contributes to the high-affinity receptor for charybdotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2853-2858.

He C, Zhang H, Mirshahi T, & Logothetis DE (1999). Identification of a potassium channel site that interacts with G protein betagamma subunits to mediate agonist-induced signaling. *J Biol Chem* **274**, 12517-12524.

Hebert SC, Desir G, Giebisch G, & Wang W (2005). Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev* **85**, 319-371.

Heginbotham L, Abramson T, & MacKinnon R (1992). A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* **258**, 1152-1155.

Heppner TJ, Bonev AD, & Nelson MT (1997). Ca²⁺-activated K⁺ channels regulate action potential repolarization in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol* **273**, C110-C117.

Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, & Kurachi Y (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* **90**, 291-366.

Hilgemann DW & Ball R (1996). Regulation of cardiac Na⁺,Ca²⁺ exchange and KATP potassium channels by PIP₂. *Science* **273**, 956-959.

Hilgemann DW, Feng S, & Nasuhoglu C (2001). The complex and intriguing lives of PIP₂ with ion channels and transporters. *Sci STKE* **2001**, re19.

Hille B (2001). *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Third Edition ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.

Ho IH & Murrell-Lagnado RD (1999). Molecular mechanism for sodium-dependent activation of G protein-gated K⁺ channels. *J Physiol* **520 Pt 3**, 645-651.

Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, & Hebert SC (1993). Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* **362**, 31-38.

Hodgkin AL & Horowicz P (1959). The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. *J Physiol* **148**, 127-160.

Horowitz LF, Hirdes W, Suh BC, Hilgemann DW, Mackie K, & Hille B (2005). Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca²⁺ requirement, and regulation of M current. *J Gen Physiol* **126**, 243-262.

Hu L, Yang H, Shi J, & Cui J (2006). Effects of multiple metal binding sites on calcium and magnesium-dependent activation of BK channels. *J Gen Physiol* **127**, 35-49.

Huang CL, Feng S, & Hilgemann DW (1998). Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* **391**, 803-806.

Huang CL, Jan YN, & Jan LY (1997). Binding of the G protein betagamma subunit to multiple regions of G protein-gated inward-rectifying K⁺ channels. *FEBS Lett* **405**, 291-298.

Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan YN, & Jan LY (1995). Evidence that direct binding of G beta gamma to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *Neuron* **15**, 1133-1143.

Hughes SA, Gibson WJ, & Young JM (2000). The interaction of U-73122 with the histamine H1 receptor: implications for the use of U-73122 in defining H1 receptor-coupled signalling pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**, 555-558.

Huth T. 4-Mode-Gating-Modell, Modellierung der Inaktivierung des Natriumkanals. 2005. Kiel. Dissertation

Huth T, Schmidtmayer J, Alzheimer C, & Hansen UP (2008). Four-mode gating model of fast inactivation of sodium channel Nav1.2a. *Pflugers Arch* **457**, 103-119.

Huth T, Schroeder I, & Hansen UP (2006). The power of two-dimensional dwell-time analysis for model discrimination, temporal resolution, multichannel analysis and level detection. *J Membr Biol* **214**, 19-32.

Inanobe A, Matsuura T, Nakagawa A, & Kurachi Y (2007). Structural diversity in the cytoplasmic region of G protein-gated inward rectifier K⁺ channels. *Channels (Austin)* **1**, 39-45.

Inanobe A, Yoshimoto Y, Horio Y, Morishige KI, Hibino H, Matsumoto S, Tokunaga Y, Maeda T, Hata Y, Takai Y, & Kurachi Y (1999). Characterization of G-protein-gated K⁺ channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *J Neurosci* **19**, 1006-1017.

Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, & Maylie J (1997). A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11651-11656.

Ivanina T, Rishal I, Varon D, Mullner C, Frohnwieser-Steinecke B, Schreibmayer W, Dessauer CW, & Dascal N (2003). Mapping the Gbetagamma-binding sites in GIRK1 and GIRK2 subunits of the G protein-activated K⁺ channel. *J Biol Chem* **278**, 29174-29183.

Jan LY & Jan YN (2000). Heartfelt crosstalk: desensitization of the GIRK current. *Nat Cell Biol* **2**, E165-E167.

Jan LY & Jan YN (1997). Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Neurosci* **20**, 91-123.

Jan LY & Jan YN (1994). Potassium channels and their evolving gates. *Nature* **371**, 119-122.

Jensen BS, Strobaek D, Christophersen P, Jorgensen TD, Hansen C, Silahtaroglu A, Olesen SP, & Ahring PK (1998). Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Am J Physiol* **275**, C848-C856.

Jensen BS, Strobaek D, Olesen SP, & Christophersen P (2001). The Ca²⁺-activated K⁺ channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments? *Curr Drug Targets* **2**, 401-422.

Jentsch TJ (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* **1**, 21-30.

Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, & MacKinnon R (2002). Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* **417**, 515-522.

Jiang Y, Pico A, Cadene M, Chait BT, & MacKinnon R (2001). Structure of the RCK domain from the E. coli K⁺ channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron* **29**, 593-601.

Jin P, Weiger TM, Wu Y, & Levitan IB (2002). Phosphorylation-dependent functional coupling of hSlo calcium-dependent potassium channel and its hbeta 4 subunit. *J Biol Chem* **277**, 10014-10020.

Jin W, Klem AM, Lewis JH, & Lu Z (1999). Mechanisms of inward-rectifier K⁺ channel inhibition by tertiapin-Q. *Biochemistry* **38**, 14294-14301.

Jin W, Lo TM, Loh HH, & Thayer SA (1994). U73122 inhibits phospholipase C-dependent calcium mobilization in neuronal cells. *Brain Res* **642**, 237-243.

Jin W & Lu Z (1998). A novel high-affinity inhibitor for inward-rectifier K⁺ channels. *Biochemistry* **37**, 13291-13299.

Kaczorowski GJ, Knaus HG, Leonard RJ, McManus OB, & Garcia ML (1996). High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. *J Bioenerg Biomembr* **28**, 255-267.

Kandel, Schwartz, & Jessell (eds.) (2000). *Principles of Neural Science*, 4th Edition ed. New York.

Kanjhan R, Coulson EJ, Adams DJ, & Bellingham MC (2005). Tertiapin-Q blocks recombinant and native large conductance K⁺ channels in a use-dependent manner. *J Pharmacol Exp Ther* **314**, 1353-1361.

Karschin A, Wischmeyer E, Döring F, & Karschin C (1997). Kalium-Einwärtsgerichteter - ursprüngliche Kanalstrukturen als Basis funktioneller Vielfalt. *Neuroforum* **4/97**, 127-132.

Karschin C, Dissmann E, Stuhmer W, & Karschin A (1996). IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K⁺ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J Neurosci* **16**, 3559-3570.

- Katz B (1949). Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Archives des Sciences Physiologiques* **3**, 285-299.
- Kitamura H, Yokoyama M, Akita H, Matsushita K, Kurachi Y, & Yamada M (2000). Tertiapin potently and selectively blocks muscarinic K(+) channels in rabbit cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **293**, 196-205.
- Klinke R & Silbernagel S (1996). *Lehrbuch der Physiologie*, 2. ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Knaus HG, Folander K, Garcia-Calvo M, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Smith M, & Swanson R (1994). Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca(2+)-activated K+ channel from smooth muscle. *J Biol Chem* **269**, 17274-17278.
- Kobayashi T, Ikeda K, Ichikawa T, Abe S, Togashi S, & Kumanishi T (1995). Molecular cloning of a mouse G-protein-activated K+ channel (mGIRK1) and distinct distributions of three GIRK (GIRK1, 2 and 3) mRNAs in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* **208**, 1166-1173.
- Krapivinsky G, Gordon EA, Wickman K, Velimirovic B, Krapivinsky L, & Clapham DE (1995). The G-protein-gated atrial K+ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K(+)-channel proteins. *Nature* **374**, 135-141.
- Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, & Vandenberg CA (2005). International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 509-526.
- Kubo Y & Murata Y (2001). Control of rectification and permeation by two distinct sites after the second transmembrane region in Kir2.1 K+ channel. *J Physiol* **531**, 645-660.
- Kubo Y, Reuveny E, Slesinger PA, Jan YN, & Jan LY (1993). Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* **364**, 802-806.
- Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, & Doyle DA (2003). Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* **300**, 1922-1926.
- Kwon SH & Guggino WB (2004). Multiple sequences in the C terminus of MaxiK channels are involved in expression, movement to the cell surface, and apical localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15237-15242.
- Latorre R, Oberhauser A, Labarca P, & Alvarez O (1989). Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol* **51**, 385-399.

Leaney JL, Benians A, Brown S, Nobles M, Kelly D, & Tinker A (2004). Rapid desensitization of G protein-gated inwardly rectifying K(+) currents is determined by G protein cycle. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C182-C191.

Lei Q, Jones MB, Talley EM, Garrison JC, & Bayliss DA (2003). Molecular mechanisms mediating inhibition of G protein-coupled inwardly-rectifying K⁺ channels. *Mol Cells* **15**, 1-9.

Lei Q, Talley EM, & Bayliss DA (2001). Receptor-mediated inhibition of G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels involves G(alpha)q family subunits, phospholipase C, and a readily diffusible messenger. *J Biol Chem* **276**, 16720-16730.

Liou HH, Zhou SS, & Huang CL (1999). Regulation of ROMK1 channel by protein kinase A via a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5820-5825.

Liu G, Shi J, Yang L, Cao L, Park SM, Cui J, & Marx SO (2004). Assembly of a Ca²⁺-dependent BK channel signaling complex by binding to beta2 adrenergic receptor. *EMBO J* **23**, 2196-2205.

Logothetis DE, Jin T, Lupyan D, & Rosenhouse-Dantsker A (2007a). Phosphoinositide-mediated gating of inwardly rectifying K(+) channels. *Pflugers Arch* **455**, 83-95.

Logothetis DE, Lupyan D, & Rosenhouse-Dantsker A (2007b). Diverse Kir modulators act in close proximity to residues implicated in phosphoinositide binding. *J Physiol* **582**, 953-965.

Logothetis DE & Zhang H (1999). Gating of G protein-sensitive inwardly rectifying K⁺ channels through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Physiol* **520 Pt 3**, 630.

Lopatin AN, Makhina EN, & Nichols CG (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* **372**, 366-369.

Lopes CM, Remon JI, Matavel A, Sui JL, Keselman I, Medei E, Shen Y, Rosenhouse-Dantsker A, Rohacs T, & Logothetis DE (2007). Protein kinase A modulates PLC-dependent regulation and PIP2-sensitivity of K⁺ channels. *Channels (Austin)* **1**, 124-134.

Lopes CM, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, & Logothetis DE (2002). Alterations in conserved Kir channel-PIP2 interactions underlie channelopathies. *Neuron* **34**, 933-944.

Loussouarn G, Park KH, Bellocq C, Baro I, Charpentier F, & Escande D (2003). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP2, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *EMBO J* **22**, 5412-5421.

Lu R, Alioua A, Kumar Y, Eghbali M, Stefani E, & Toro L (2006). MaxiK channel partners: physiological impact. *J Physiol* **570**, 65-72.

- Lu T, Wu L, Xiao J, & Yang J (2001). Permeant ion-dependent changes in gating of Kir2.1 inward rectifier potassium channels. *J Gen Physiol* **118**, 509-522.
- Lu Z (2004). Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels. *Annu Rev Physiol* **66**, 103-129.
- Lu Z & MacKinnon R (1994). Electrostatic tuning of Mg²⁺ affinity in an inward-rectifier K⁺ channel. *Nature* **371**, 243-246.
- MacKinnon R (1995). Pore loops: an emerging theme in ion channel structure. *Neuron* **14**, 889-892.
- Magleby KL (2003). Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. *J Gen Physiol* **121**, 81-96.
- Marescaux C, Vergnes M, & Bernasconi R (1992). GABAB receptor antagonists: potential new anti-absence drugs. *J Neural Transm Suppl* **35**, 179-188.
- Mark MD & Herlitze S (2000). G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur J Biochem* **267**, 5830-5836.
- Marrion NV (1997). Control of M-current. *Annu Rev Physiol* **59**, 483-504.
- McLaughlin S, Wang J, Gambhir A, & Murray D (2002). PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**, 151-175.
- McManus OB, Helms LM, Pallanck L, Ganetzky B, Swanson R, & Leonard RJ (1995). Functional role of the beta subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* **14**, 645-650.
- Meeder T & Ulbricht W (1987). Action of benzocaine on sodium channels of frog nodes of Ranvier treated with chloramine-T. *Pflugers Arch* **409**, 265-273.
- Meera P, Wallner M, Jiang Z, & Toro L (1996). A calcium switch for the functional coupling between alpha (hslo) and beta subunits (KV,Ca beta) of maxi K channels. *FEBS Lett* **382**, 84-88.
- Meera P, Wallner M, Song M, & Toro L (1997). Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14066-14071.

- Meera P, Wallner M, & Toro L (2000). A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5562-5567.
- Meyer T, Wellner-Kienitz MC, Biewald A, Bender K, Eickel A, & Pott L (2001). Depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by activation of phospholipase C-coupled receptors causes slow inhibition but not desensitization of G protein-gated inward rectifier K⁺ current in atrial myocytes. *J Biol Chem* **276**, 5650-5658.
- Miake J, Marban E, & Nuss HB (2003). Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression. *J Clin Invest* **111**, 1529-1536.
- Mizuno N & Itoh H (2009). Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. *Neurosignals* **17**, 42-54.
- Mogami H, Lloyd MC, & Gallacher DV (1997). Phospholipase C inhibitor, U73122, releases intracellular Ca²⁺, potentiates Ins(1,4,5)P₃-mediated Ca²⁺ release and directly activates ion channels in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem J* **324 (Pt 2)**, 645-651.
- Moss BL & Magleby KL (2001). Gating and conductance properties of BK channels are modulated by the S9-S10 tail domain of the alpha subunit. A study of mSlo1 and mSlo3 wild-type and chimeric channels. *J Gen Physiol* **118**, 711-734.
- Moss BL, Silberberg SD, Nimigean CM, & Magleby KL (1999). Ca²⁺-dependent gating mechanisms for dSlo, a large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channel. *Biophys J* **76**, 3099-3117.
- Muto Y, Nagao T, & Urushidani T (1997). The putative phospholipase C inhibitor U73122 and its negative control, U73343, elicit unexpected effects on the rabbit parietal cell. *J Pharmacol Exp Ther* **282**, 1379-1388.
- Nam JH, Lee HS, Nguyen YH, Kang TM, Lee SW, Kim HY, Kim SJ, Earm YE, & Kim SJ (2007). Mechanosensitive activation of K⁺ channel via phospholipase C-induced depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in B lymphocytes. *J Physiol* **582**, 977-990.
- Nehrke K, Quinn CC, & Begenisich T (2003). Molecular identification of Ca²⁺-activated K⁺ channels in parotid acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C535-C546.
- Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, & Lederer WJ (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* **270**, 633-637.
- Nichols CG, Ho K, & Hebert S (1994). Mg²⁺-dependent inward rectification of ROMK1 potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **476**, 399-409.

Nichols CG & Lopatin AN (1997). Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* **59**, 171-191.

Nimigean CM & Magleby KL (2000). Functional coupling of the beta(1) subunit to the large conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in the absence of Ca(2+). Increased Ca(2+) sensitivity from a Ca(2+)-independent mechanism. *J Gen Physiol* **115**, 719-736.

Nishida M & MacKinnon R (2002). Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* **111**, 957-965.

Numberger M & Draguhn A (1996). *Patch-Clamp-Technik* Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Orio P, Rojas P, Ferreira G, & Latorre R (2002). New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News Physiol Sci* **17**, 156-161.

Pegan S, Arrabit C, Zhou W, Kwiatkowski W, Collins A, Slesinger PA, & Choe S (2005). Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci* **8**, 279-287.

Peleg S, Varon D, Ivanina T, Dessauer CW, & Dascal N (2002). G(alpha)(i) controls the gating of the G protein-activated K(+) channel, GIRK. *Neuron* **33**, 87-99.

Petit-Jacques J, Sui JL, & Logothetis DE (1999). Synergistic activation of G protein-gated inwardly rectifying potassium channels by the betagamma subunits of G proteins and Na(+) and Mg(2+) ions. *J Gen Physiol* **114**, 673-684.

Piskorowski R & Aldrich RW (2002). Calcium activation of BK(Ca) potassium channels lacking the calcium bowl and RCK domains. *Nature* **420**, 499-502.

Piskorowski R & Aldrich RW (2006). Relationship between pore occupancy and gating in BK potassium channels. *J Gen Physiol* **127**, 557-576.

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, & Cormier MJ (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233.

Proks P, Capener CE, Jones P, & Ashcroft FM (2001). Mutations within the P-loop of Kir6.2 modulate the intraburst kinetics of the ATP-sensitive potassium channel. *J Gen Physiol* **118**, 341-353.

Prüß H. Kir2 potassium channels in rat striatum are strategically localized to control basal ganglia function. 2004. Berlin.
Ref Type: Thesis/Dissertation

- Ramanathan K, Michael TH, & Fuchs PA (2000). beta subunits modulate alternatively spliced, large conductance, calcium-activated potassium channels of avian hair cells. *J Neurosci* **20**, 1675-1684.
- Ransom CB, Liu X, & Sontheimer H (2002). BK channels in human glioma cells have enhanced calcium sensitivity. *Glia* **38**, 281-291.
- Rapedius M, Fowler PW, Shang L, Sansom MS, Tucker SJ, & Baukrowitz T (2007). H bonding at the helix-bundle crossing controls gating in Kir potassium channels. *Neuron* **55**, 602-614.
- Reimann F & Ashcroft FM (1999). Inwardly rectifying potassium channels. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 503-508.
- Rhee SG (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* **70**, 281-312.
- Rishal I, Porozov Y, Yakubovich D, Varon D, & Dascal N (2005). Gbetagamma-dependent and Gbetagamma-independent basal activity of G protein-activated K⁺ channels. *J Biol Chem* **280**, 16685-16694.
- Robitaille R, Adler EM, & Charlton MP (1993). Calcium channels and calcium-gated potassium channels at the frog neuromuscular junction. *J Physiol Paris* **87**, 15-24.
- Robitaille R & Charlton MP (1992). Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J Neurosci* **12**, 297-305.
- Rohacs T, Chen J, Prestwich GD, & Logothetis DE (1999). Distinct specificities of inwardly rectifying K⁺ channels for phosphoinositides. *J Biol Chem* **274**, 36065-36072.
- Rohacs T, Lopes CM, Jin T, Ramdya PP, Molnar Z, & Logothetis DE (2003). Specificity of activation by phosphoinositides determines lipid regulation of Kir channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 745-750.
- Ruppertsberg JP (2000). Intracellular regulation of inward rectifier K⁺ channels. *Pflugers Arch* **441**, 1-11.
- Sackin H, Vasilyev A, Palmer LG, & Krambis M (2003). Permeant cations and blockers modulate pH gating of ROMK channels. *Biophys J* **84**, 910-921.
- Salkoff L (2006). A tail of multiple calcium-sensing domains. *J Gen Physiol* **128**, 387-388.
- Salkoff L, Butler A, Ferreira G, Santi C, & Wei A (2006). High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci* **7**, 921-931.

Sambrook J, Fritsch EF, & Maniatis T (1998). *Molecular Cloning: a laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, & Keating MT (1996). Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* **384**, 80-83.

Sanguinetti MC & Spector PS (1997). Potassium channelopathies. *Neuropharmacology* **36**, 755-762.

Schmalhofer WA, Bao J, McManus OB, Green B, Matyskiela M, Wunderler D, Bugianesi RM, Felix JP, Hanner M, Linde-Arias AR, Ponte CG, Velasco L, Koo G, Staruch MJ, Miao S, Parsons WH, Rupprecht K, Slaughter RS, Kaczorowski GJ, & Garcia ML (2002). Identification of a new class of inhibitors of the voltage-gated potassium channel, Kv1.3, with immunosuppressant properties. *Biochemistry* **41**, 7781-7794.

Schmalhofer WA, Sanchez M, Dai G, Dewan A, Secades L, Hanner M, Knaus HG, McManus OB, Kohler M, Kaczorowski GJ, & Garcia ML (2005). Role of the C-terminus of the high-conductance calcium-activated potassium channel in channel structure and function. *Biochemistry* **44**, 10135-10144.

Schreiber M & Salkoff L (1997). A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J* **73**, 1355-1363.

Schreiber M, Yuan A, & Salkoff L (1999). Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nat Neurosci* **2**, 416-421.

Schroeder BC, Hechenberger M, Weinreich F, Kubisch C, & Jentsch TJ (2000). KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J Biol Chem* **275**, 24089-24095.

Schroeder BC, Kubisch C, Stein V, & Jentsch TJ (1998). Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* **396**, 687-690.

Schroeder I & Hansen UP (2007). Saturation and microsecond gating of current indicate depletion-induced instability of the MaxiK selectivity filter. *J Gen Physiol* **130**, 83-97.

Schroeder I & Hansen UP (2008). Tl⁺-induced microsecond gating of current indicates instability of the MaxiK selectivity filter as caused by ion/pore interaction. *J Gen Physiol* **131**, 365-378.

Schroeder I & Hansen UP (2009). Using a five-state model for fitting amplitude histograms from MaxiK channels: beta-distributions reveal more than expected. *Eur Biophys J* **38**, 1101-1114.

- Schubert R & Nelson MT (2001). Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 505-512.
- Schulze D, Krauter T, Fritzenschaft H, Soom M, & Baukrowitz T (2003). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) modulation of ATP and pH sensitivity in Kir channels. A tale of an active and a silent PIP2 site in the N terminus. *J Biol Chem* **278**, 10500-10505.
- Schumacher MA, Rivard AF, Bachinger HP, & Adelman JP (2001). Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin. *Nature* **410**, 1120-1124.
- Selyanko AA, Hadley JK, Wood IC, Abogadie FC, Jentsch TJ, & Brown DA (2000). Inhibition of KCNQ1-4 potassium channels expressed in mammalian cells via M1 muscarinic acetylcholine receptors. *J Physiol* **522 Pt 3**, 349-355.
- Shi J & Cui J (2001). Intracellular Mg(2+) enhances the function of BK-type Ca(2+)-activated K(+) channels. *J Gen Physiol* **118**, 589-606.
- Shi J, Krishnamoorthy G, Yang Y, Hu L, Chaturvedi N, Harilal D, Qin J, & Cui J (2002). Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels. *Nature* **418**, 876-880.
- Shyng SL, Cukras CA, Harwood J, & Nichols CG (2000). Structural determinants of PIP(2) regulation of inward rectifier K(ATP) channels. *J Gen Physiol* **116**, 599-608.
- Shyng SL & Nichols CG (1998). Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of KATP channels. *Science* **282**, 1138-1141.
- Sickmann T & Alzheimer C (2002). Agonist-specific maturation of GIRK current responses in acutely isolated pyramidal neurons of rat neocortex. *Brain Res* **929**, 166-174.
- Sickmann T & Alzheimer C (2003). Short-term desensitization of G-protein-activated, inwardly rectifying K⁺ (GIRK) currents in pyramidal neurons of rat neocortex. *J Neurophysiol* **90**, 2494-2503.
- Sickmann T, Klose A, Huth T, & Alzheimer C (2008). Unexpected suppression of neuronal G protein-activated, inwardly rectifying K⁺ current by common phospholipase C inhibitor. *Neurosci Lett* **436**, 102-106.
- Sievers B. Etablierung einer mit rekombinanten Calciumkanälen transfizierten Zelllinie zur elektrophysiologischen Untersuchung der molekularen Wirkung ionenkanalspezifischer Neurotoxine. 2004. Kiel. Diplomarbeit

Signorini S, Liao YJ, Duncan SA, Jan LY, & Stoffel M (1997). Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein-coupled, inwardly rectifying K⁺ channel GIRK2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 923-927.

Sigworth FJ & Sine SM (1987). Data transformations for improved display and fitting of single-channel dwell time histograms. *Biophys J* **52**, 1047-1054.

Slesinger PA, Reuveny E, Jan YN, & Jan LY (1995). Identification of structural elements involved in G protein gating of the GIRK1 potassium channel. *Neuron* **15**, 1145-1156.

Smith RJ, Sam LM, Justen JM, Bundy GL, Bala GA, & Bleasdale JE (1990). Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J Pharmacol Exp Ther* **253**, 688-697.

Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO, & Sternweis PC (1991). Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* **251**, 804-807.

Sodickson DL & Bean BP (1996). GABAB receptor-activated inwardly rectifying potassium current in dissociated hippocampal CA3 neurons. *J Neurosci* **16**, 6374-6385.

Stanfield PR, Nakajima S, & Nakajima Y (2002). Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier K⁺ channels: Kir2.0 and Kir3.0. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **145**, 47-179.

Stauffer TP, Ahn S, & Meyer T (1998). Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P₂ concentration monitored in living cells. *Curr Biol* **8**, 343-346.

Stefani E, Ottolia M, Noceti F, Olcese R, Wallner M, Latorre R, & Toro L (1997). Voltage-controlled gating in a large conductance Ca²⁺-sensitive K⁺channel (hsl_o). *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5427-5431.

Suh BC & Hille B (2005). Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 370-378.

Suh BC & Hille B (2008). PIP₂ is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annu Rev Biophys* **37**, 175-195.

Suh BC, Horowitz LF, Hirdes W, Mackie K, & Hille B (2004). Regulation of KCNQ2/KCNQ3 current by G protein cycling: the kinetics of receptor-mediated signaling by Gq. *J Gen Physiol* **123**, 663-683.

Suh BC, Inoue T, Meyer T, & Hille B (2006). Rapid chemically induced changes of PtdIns(4,5)P₂ gate KCNQ ion channels. *Science* **314**, 1454-1457.

- Sui JL, Petit-Jacques J, & Logothetis DE (1998). Activation of the atrial K_{ACh} channel by the betagamma subunits of G proteins or intracellular Na⁺ ions depends on the presence of phosphatidylinositol phosphates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1307-1312.
- Sun XP, Yazejian B, & Grinnell AD (2004). Electrophysiological properties of BK channels in *Xenopus* motor nerve terminals. *J Physiol* **557**, 207-228.
- Takigawa T & Alzheimer C (1999). G protein-activated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) currents in dendrites of rat neocortical pyramidal cells. *J Physiol* **517 (Pt 2)**, 385-390.
- Tawil R, Ptacek LJ, Pavlakis SG, DeVivo DC, Penn AS, Ozdemir C, & Griggs RC (1994). Andersen's syndrome: potassium-sensitive periodic paralysis, ventricular ectopy, and dysmorphic features. *Ann Neurol* **35**, 326-330.
- Tian L, Coghill LS, MacDonald SH, Armstrong DL, & Shipston MJ (2003). Leucine zipper domain targets cAMP-dependent protein kinase to mammalian BK channels. *J Biol Chem* **278**, 8669-8677.
- Tinker A & Jan LY (1999). Functional Analyses of G-Protein Activation of Cardiac K_G Channel. *Current Topics in Membranes and Transport* **46**, 143-158.
- Tinker A, Jan YN, & Jan LY (1996). Regions responsible for the assembly of inwardly rectifying potassium channels. *Cell* **87**, 857-868.
- Toro L, Wallner M, Meera P, & Tanaka Y (1998). Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily. *News Physiol Sci* **13**, 112-117.
- Trapp S, Proks P, Tucker SJ, & Ashcroft FM (1998). Molecular analysis of ATP-sensitive K channel gating and implications for channel inhibition by ATP. *J Gen Physiol* **112**, 333-349.
- Velimirovic BM, Koyano K, Nakajima S, & Nakajima Y (1995). Opposing mechanisms of regulation of a G-protein-coupled inward rectifier K⁺ channel in rat brain neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1590-1594.
- Venance SL, Cannon SC, Fialho D, Fontaine B, Hanna MG, Ptacek LJ, Tristani-Firouzi M, Tawil R, & Griggs RC (2006). The primary periodic paralyses: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Brain* **129**, 8-17.
- Vergara C, Latorre R, Marrion NV, & Adelman JP (1998). Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* **8**, 321-329.
- Vickers JD (1993). U73122 affects the equilibria between the phosphoinositides as well as phospholipase C activity in unstimulated and thrombin-stimulated human and rabbit platelets. *J Pharmacol Exp Ther* **266**, 1156-1163.

- Vogalis F, Vincent T, Qureshi I, Schmalz F, Ward MW, Sanders KM, & Horowitz B (1996). Cloning and expression of the large-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel from colonic smooth muscle. *Am J Physiol* **271**, G629-G639.
- Walenga R, Vanderhoek JY, & Feinstein MB (1980). Serine esterase inhibitors block stimulus-induced mobilization of arachidonic acid and phosphatidylinositide-specific phospholipase C activity in platelets. *J Biol Chem* **255**, 6024-6027.
- Walker EM, Bispham JR, & Hill SJ (1998). Nonselective effects of the putative phospholipase C inhibitor, U73122, on adenosine A1 receptor-mediated signal transduction events in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol* **56**, 1455-1462.
- Wallner M, Meera P, Ottolia M, Kaczorowski GJ, Latorre R, Garcia ML, Stefani E, & Toro L (1995). Characterization of and modulation by a beta-subunit of a human maxi KCa channel cloned from myometrium. *Receptors Channels* **3**, 185-199.
- Wallner M, Meera P, & Toro L (1999). Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channels: a transmembrane beta-subunit homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4137-4142.
- Wallner M, Meera P, & Toro L (1996). Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca(2+)-sensitive K⁺ channels: an additional transmembrane region at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14922-14927.
- Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, & McKinnon D (1998). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* **282**, 1890-1893.
- Wang J, Zhou Y, Wen H, & Levitan IB (1999). Simultaneous binding of two protein kinases to a calcium-dependent potassium channel. *J Neurosci* **19**, RC4.
- Wang WH & Giebisch G (1991). Dual modulation of renal ATP-sensitive K⁺ channel by protein kinases A and C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9722-9725.
- Warth R, Hamm K, Bleich M, Kunzelmann K, von HT, Schreiber R, Ullrich E, Mengel M, Trautmann N, Kindle P, Schwab A, & Greger R (1999). Molecular and functional characterization of the small Ca(2+)-regulated K⁺ channel (rSK4) of colonic crypts. *Pflugers Arch* **438**, 437-444.
- Wei A, Solaro C, Lingle C, & Salkoff L (1994). Calcium sensitivity of BK-type KCa channels determined by a separable domain. *Neuron* **13**, 671-681.
- Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, & Wulff H (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 463-472.

Wellman GC & Nelson MT (2003). Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of Ca²⁺-sensitive ion channels. *Cell Calcium* **34**, 211-229.

Willars GB, McArdle CA, & Nahorski SR (1998). Acute desensitization of phospholipase C-coupled muscarinic M3 receptors but not gonadotropin-releasing hormone receptors co-expressed in alphaT3-1 cells: implications for mechanisms of rapid desensitization. *Biochem J* **333 (Pt 2)**, 301-308.

Wischmeyer E, Doring F, & Karschin A (1998). Acute suppression of inwardly rectifying Kir2.1 channels by direct tyrosine kinase phosphorylation. *J Biol Chem* **273**, 34063-34068.

Wischmeyer E & Karschin A (1996). Receptor stimulation causes slow inhibition of IRK1 inwardly rectifying K⁺ channels by direct protein kinase A-mediated phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5819-5823.

Xia XM, Zeng X, & Lingle CJ (2002). Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* **418**, 880-884.

Xiao J, Zhen XG, & Yang J (2003). Localization of PIP2 activation gate in inward rectifier K⁺ channels. *Nat Neurosci* **6**, 811-818.

Xie LH, John SA, Ribalet B, & Weiss JN (2005). Long polyamines act as cofactors in PIP2 activation of inward rectifier potassium (Kir2.1) channels. *J Gen Physiol* **126**, 541-549.

Xie LH, John SA, Ribalet B, & Weiss JN (2007). Activation of inwardly rectifying potassium (Kir) channels by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2): interaction with other regulatory ligands. *Prog Biophys Mol Biol* **94**, 320-335.

Xie LH, John SA, Ribalet B, & Weiss JN (2004). Regulation of gating by negative charges in the cytoplasmic pore in the Kir2.1 channel. *J Physiol* **561**, 159-168.

Xu X & Nelson JW (1993). Solution structure of tertiapin determined using nuclear magnetic resonance and distance geometry. *Proteins* **17**, 124-137.

Yakubovich D, Pastushenko V, Bitler A, Dessauer CW, & Dascal N (2000). Slow modal gating of single G protein-activated K⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **524 Pt 3**, 737-755.

Yamaguchi H, Sakamoto N, Watanabe Y, Saito T, Masuda Y, & Nakaya H (1997). Dual effects of endothelins on the muscarinic K⁺ current in guinea pig atrial cells. *Am J Physiol* **273**, H1745-H1753.

Yang J, Jan YN, & Jan LY (1995). Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron* **15**, 1441-1447.

Yellen G (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* **419**, 35-42.

Zeng WZ, Li XJ, Hilgemann DW, & Huang CL (2003a). Protein kinase C inhibits ROMK1 channel activity via a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent mechanism. *J Biol Chem* **278**, 16852-16856.

Zeng XH, Xia XM, & Lingle CJ (2003b). Redox-sensitive extracellular gates formed by auxiliary beta subunits of calcium-activated potassium channels. *Nat Struct Biol* **10**, 448-454.

Zhang G & Horrigan FT (2005). Cysteine modification alters voltage- and Ca(2+)-dependent gating of large conductance (BK) potassium channels. *J Gen Physiol* **125**, 213-236.

Zhang G, Xu R, Heinemann SH, & Hoshi T (2006). Cysteine oxidation and rundown of large-conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *Biochem Biophys Res Commun* **342**, 1389-1395.

Zhang H, Craciun LC, Mirshahi T, Rohacs T, Lopes CM, Jin T, & Logothetis DE (2003). PIP(2) activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* **37**, 963-975.

Zhang H, He C, Yan X, Mirshahi T, & Logothetis DE (1999). Activation of inwardly rectifying K⁺ channels by distinct PtdIns(4,5)P₂ interactions. *Nat Cell Biol* **1**, 183-188.

Zhang X, Solaro CR, & Lingle CJ (2001). Allosteric regulation of BK channel gating by Ca(2+) and Mg(2+) through a nonselective, low affinity divalent cation site. *J Gen Physiol* **118**, 607-636.

Zhou W, Arrabit C, Choe S, & Slesinger PA (2001a). Mechanism underlying bupivacaine inhibition of G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6482-6487.

Zhou XB, Arntz C, Kamm S, Motejlek K, Sausbier U, Wang GX, Ruth P, & Korth M (2001b). A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase. *J Biol Chem* **276**, 43239-43245.

Zhou XB, Wulfsen I, Lutz S, Utku E, Sausbier U, Ruth P, Wieland T, & Korth M (2008). M2 muscarinic receptors induce airway smooth muscle activation via a dual, Gbetagamma-mediated inhibition of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity. *J Biol Chem* **283**, 21036-21044.

Zhou Y, Wang J, Wen H, Kucherovsky O, & Levitan IB (2002). Modulation of Drosophila slowpoke calcium-dependent potassium channel activity by bound protein kinase a catalytic subunit. *J Neurosci* **22**, 3855-3863.

7. Anhang

7.1 Materialien

Chemikalien

Substanz	Katalog-Nr.	Bezugsquelle
CO ₂		Hüllmann (Kiel, Deutschland)
O ₂		Hüllmann (Kiel, Deutschland)
NaCl	#6404	Merck (Darmstadt, Deutschland)
KCl	#4936	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaOH	#6498	Merck (Darmstadt, Deutschland)
KOH	#5033	Merck (Darmstadt, Deutschland)
CaCl ₂	#2382	Merck (Darmstadt, Deutschland)
MgCl ₂	#5833	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaHCO ₂	#6329	Merck (Darmstadt, Deutschland)
K ⁺ -D-Glukonat	#60245	Fluka (Buchs, Schweiz)
Na ₂ HPO ₄	#6586	Merck (Darmstadt, Deutschland)
KH ₂ PO ₄	#4877	Merck (Darmstadt, Deutschland)
CdCl ₂	#202908	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
HEPES	#H3375	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Na ⁺ -HEPES	#H7006	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
EGTA	#E4378	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
BAPTA	#A4926	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
D-Glucose	#8342	Merck (Darmstadt, Deutschland)
D-Saccharose	#7687	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Mannitol	#M9546	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
ATP	#A9062	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Na ₂ ATP	#A7699	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
GDP	#G7127	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
NaGTP	#G8877	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
GTP _γ S	#G8634	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Kynurenic acid	#K3375	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Papain	#P4762	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Ethanol	#510	Walter (Kiel, Deutschland)
Natriumacetat	#6268	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycerol	#G5150	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Ketamin-Hydrochlorid	#K2753	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Xylazin-Hydrochlorid	#X1251	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Ampicillin	#K029	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kanamycin	#T832	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin / Streptomycin	#A2213	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Tetracyclin	#0237	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Geneticin (G-418 Sulfat)	#11811	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Hygromycin B	#10687	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Zeocin	#R250	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Bacto™ Agar	#2140	Difco (Heidelberg, Deutschland)

Luria Broth Base, Miller Medium	#X968	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose	#11380	Serva (Heidelberg, Deutschland)
MEM-Medium	#41090	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
D-MEM Medium	#42430	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
FCS (Fetales Kälberserum)	#S0115	Biochrom (Berlin, Deutschland)
TBE- (Tris-Borat-EDTA) Puffer	#3061	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PBS	#H15-002	PAA (Pasching, Austria)
Trypan-Blau	#15250	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin-EDTA	#L11-004	PAA (Pasching, Austria)
Superfect	#301305	Qiagen (Hilden, Deutschland)
SYBR Safe™ DNA Gel Stain	#S33102	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Ethidium-Bromid	#E8751	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	#D2650	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
TEA-Chlorid	# T2265	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Baclofen	#B5399	Biomol (Hamburg, Deutschland)
Serotonin	#H9523	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Ba ²⁺ -Chlorid	#B6394	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Tetrodotoxin (TTX)	#1069	Tocris (Bristol, UK)
U73122	#U6756	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
	#ST391	Biomol (Hamburg, Deutschland)
U73343	#U6881	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
	#ST392	Biomol (Hamburg, Deutschland)
m-3M3FBS	#T5699	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
NCDC	#N7001	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
N-Ethylmaleimid (NEM)	#04259	Fluka (Buchs, Schweiz)
Bupivacain	#B5274	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Tertiapin - Q	#T1567	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
	#1316	Tocris (Bristol, UK)
Linopiridin-Dihydrochlorid	#1999	Tocris (Bristol, UK)
Clotrimazol	#C6019	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
B293	#C2615	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Sigmacote®	#SL2	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Poly D-Lysine Hydrobromid	#P7280	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Calcium Calibration Buffer Kit#1	#C3008	MoBiTec (Göttingen, Deutschland)

Enzyme, Kits und DNA

Substanz	Katalog-Nr.	Bezugsquelle
Apa	#R6361	Promega (Mannheim, Deutschland)
Cla I	#R6551	Promega (Mannheim, Deutschland)
EcoR I	#R6011	Promega (Mannheim, Deutschland)
Hae II	#R6661	Promega (Mannheim, Deutschland)
Hind III	#R6041	Promega (Mannheim, Deutschland)
Nco I	#R6513	Promega (Mannheim, Deutschland)
Sac I	#R6061	Promega (Mannheim, Deutschland)
Sma I	#R6121	Promega (Mannheim, Deutschland)

QIAprep Spin Miniprep Kit	#27104	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Qiafilter Plasmid Maxi Kit	#12262	Qiagen (Hilden, Deutschland)
GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit	#NA0300	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	#200521	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
LongRange PCR Kit	#206402	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAquick PCR Purification Kit	#28104	Qiagen (Hilden, Deutschland)
pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit	#K240020	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
PCR Master Mix	#M7502	Promega (Mannheim, Deutschland)
Taq DNA Polymerase	#M1661	Promega (Mannheim, Deutschland)
1 kb DNA Ladder	#G5711	Promega (Mannheim, Deutschland)
loading dye	#G1881	Promega (Mannheim, Deutschland)
pEGFP-C1		Clontech (Mountain View, CA, USA)
One Shot Top10/P3 – E.coli	#C505003	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Primer		MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien

Gegenstand	Katalog-Nr.	Bezugsquelle
Petrischalen für Zellkultur 35 mm	#430165	Corning (Acton, USA)
50 ml Kulturflaschen 25 cm ²	#83.1810.002	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
250 ml Kulturflaschen 75 cm ²	#83.1813.002	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Glasbodenschalen	#FD35-100	World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA)
Petrischalen für Bakterien 100 mm	#82.1473.001	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Sterile Tubes 50 ml	#62.547.004	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Sterile Tubes 15 ml	#62.554.002	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Kryotubes	#72.694.005	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Serologische Pipetten 10 ml	#86.1254.001	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Serologische Pipetten 25 ml	#86.1685.001	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Spritzenfilamente – Microfil 34A WG	#MF34G-50	World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA)
Borosilikatglas-Rohlinge AD 1,5; ID1,17; Filament	#30-0066	Harvard Apparatus (Edenbridge, Kent, England)
Borosilikatglas-Rohlinge AD 1,5; ID0,86; Filament	#30-0057	Harvard Apparatus (Edenbridge, Kent, England)
Borosilikatglas-Rohlinge AD 1,5; ID0,86; ohne Filament	#30-0053	Harvard Apparatus (Edenbridge, Kent, England)
Pasteurpipetten	#9411031	Eydam (Kiel, Deutschland)
Mira cloth-Filter	#475855	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)

Calcium Ionophore II-Membrane A, Selectophore [®] , Nr. 21189	#21189	Fluka (Buchs, Schweiz)
weitere Verbrauchsmaterialien: Pipettenspitzen, PCR-Tubes,...		Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

Geräte

Centrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Spectrafuge mini	neolab (Heidelberg, Deutschland)
IKA [®] MS2 Minishaker	Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Biofuge fresco	Heraeus (Langenselbold, Deutschland)
Multifuge 3S-R	Heraeus (Langenselbold, Deutschland)
Labofuge 400R	Heraeus (Langenselbold, Deutschland)
HeraSafe Cleanbench	Heraeus (Langenselbold, Deutschland)
HeraCell 150 Brutschrank für Zellkultur	Heraeus (Langenselbold, Deutschland)
Inkubator innova [™] 4230	New Brunswick (Nürtingen, Deutschland)
Autoklave	Webecke (Bad Schwartau, Deutschland)
Mastercycler [®] gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Spectrophotometer NanoDrop [®] ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Elektrophoreseeinheit Mini-Sub Cell GT	BIO-RAD (München, Deutschland)
Transilluminator	LTF Labortechnik (Wasserburg, Deutschland)
Videodokumentationssystem	LTF Labortechnik (Wasserburg, Deutschland)
Pipettierhilfe – Pipetus standard	Eydam (Kiel, Deutschland)
Neubauer Zählkammer (improved)	Assistent (Sondheim, Deutschland)
DMZ-Universal-Pipettenpuller	Zeit-Instruments (München, Deutschland)
Vibratom VT 1000S	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Konfokales Mikroskop LSM510	Zeiss (Jena, Deutschland)
Inverses Mikroskop Axiovert 200 M mit Physiologie-Modul	Zeiss (Jena, Deutschland)
Inverses Mikroskop Axiovert 35 mit Hoffman-Phasenkontrastoptik für Zellkultur	Zeiss (Jena, Deutschland)
Patch-Clamp-Verstärker Axopatch 200B	Molecular Devices / MDS Analytical Technologies (Sunnyvale, CA, USA)
Digitizer Box Digidata 1322A	Molecular Devices / MDS Analytical Technologies (Sunnyvale, CA, USA)
Oszilloskop PM3215	Philips (Hamburg, Deutschland)
Schwingungsgedämpfter Tisch Vibraplane 9101	Kinetic Systems (Boston, MA, USA)
Hydraulischer Mikromanipulator	Narishige (Tokyo, Japan)
HQ-Filterset für EGFP Fluoreszenzfilterset HQ-EGFP	AHF Analysentechnik (Tübingen, Deutschland)
High-Power-LED-Modul	Rapp OptoElectronic GmbH (Hamburg, Deutschland)
pClamp9.2-Software	Molecular Devices / MDS Analytical Technologies (Sunnyvale, CA, USA)
OriginPro 7G-Software	Origin Lab Corp (Northampton, MA, USA)

7.2 Gensequenzen der Wildtyp-Kanäle

Im Folgenden wurden nur die kodierenden Gensequenzen aufgelistet. Alle Basensequenzen wurden von 5' nach 3' dargestellt.

Basensequenz des Kir2.1r (IRK1)

ATGGGCAGTGTGAGAACCAACCGCTACAGCATCGTCTCTTCGGAGGAAGACGGCATGAAGCTGG
 CCACCATGGCCGTCGCCAATGGCTTTGGGAATGGCAAGAGTAAAGTCCATACCCGACAACAGTG
 CAGGAGCCGCTTTGTGAAGAAAGACGGGCATTGCAACGTTTCAGTTTATCAACGTGGGAGAGAAA
 GGACAGAGGTACCTGGCGGACATCTTTACTACCTGTGTGGACATCCGCTGGCGGTGGATGCTGG
 TAATCTTCTGCCTCGCATTTCGTGCTCTCCTGGCTGTTCTTTGGCTGTGTGTTTTGGTTGATAGCTC
 TGCTCCACGGGGATCTGGATGCTTCTAAAGAGAGCAAAGCGTGTGTGTCTGAGGTCAACAGCTT
 CACGGCTGCCTTCTCTTCTCCATTGAGACCCAGACAACCATCGGCTATGGTTTCAGGTGTGTTA
 CAGACGAGTGCCCGATTGCTGTTTTTCATGGTGGTATTCCAGTCAATCGTGGGCTGCATCATCGAC
 GCCTTCATCATTGGTGCAGTCATGGCGAAGATGGCGAAGCCAAAGAAGAGGAATGAGACTCTGG
 TCTTCAGCCACAACGCTGTGATTGCCATGAGGGACGGCAAACCTCTGCTTGATGTGGAGAGTGGG
 CAACCTTCGCAAGAGCCACCTTGTTGGAAGCTCATGTCCGGGCACAGCTTCTCAAATCTAGGATCA
 CTTTCAAGGGGAGTACATCCCCTTGGACCAGATAGACATCAACGTTGGTTTCGATAGCGGAATC
 GACCGTATATTTCTAGTGTCCCAATCACTATTGTCCATGAAATAGACGAAGACAGCCCTTTGTAT
 GACTTGAGTAAGCAGGACATTGACAATGCAGACTTTGAAATCGTTGTCATCCTGGAAGGCATGGT
 GGAGGCCACTGCCATGACAACGCAATGCCGGAGTTCATATCTGGCCAATGAGATTCTCTGGGGT
 CACCGCTACGAGCCGGTGCTCTTTGAAGAGAAGCATTGCTATAAAGTAGACTATTCAAGATTCCA
 TAAGACTTACGAAGTACCTAACACTCCCCTTTGTAGTGCCAGAGACTTAGCAGAGAAGAAATACAT
 CCTCTCAAATGCAAATTCATTTTGTATGAAAATGAAGTTGCCCTAACAGCAAAGAGGAAGAGGA
 CAGTGAGAACGGAGTTCAGAGAGCACAAGTACGGACTCACCTCCTGGCATAGATCTCCACAAC
 CAGGCGAGCGTGCCTCTAGAGCCCAGGCCTTTAAGGCGAGAATCGGAGATATGA

Basensequenz des Kir3.1r (GIRK1)

ATGTCTGCACTCCGAAGGAAATTTGGGGACGATTACCAGGTAGTGACCACTTCGTCCAGCGGTTCC
 GGGCTTGCAGCCCCAGGGGCCAGGACAGGGCCCACAGCAGCAGCTTGTACCCAAGAAGAAACG
 GCAGCGGTTTCGTGGACAAGAACGGTCGGTGCAATGTGCAGCACGGCAACCTGGGCAGCGAGAC
 CAGTCGCTACCTTTCCGACCTCTTCACTACCCTGGTGGATCTCAAGTGGCGTTGGAACCTCTTTA
 TCTTCATCCTCACCTACACCGTGGCCTGGCTCTTCATGGCGTCCATGTGGTGGGTGATCGCTTAT
 ACCCGGGGCGACCTGAACAAAGCCCATGTCGGCAACTACACTCCCTGTGTGGCCAATGTCTATA
 ACTTCCCCTCTGCCTTCTTTTCTTCATCGAGACCGAGGCCACCATCGGCTATGGCTACCGCTAC
 ATCACCGACAAGTGCCCCGAGGGCATCATCCTTTTCTTTTCCAGTCCATCCTTGGCTCCATCGT
 GGACGCTTTCCTCATCGGCTGCATGTTTCATCAAGATGTCCAGCCAAAAGCGCGCCGAGACC
 CTCATGTTTAGCGAGCATGCGGTTATTTCCATGAGGGACGGAAAACCTACTCTCATGTTCCGGGT
 GGGCAACCTGCGCAACAGCCACATGGTCTCCGCGCAGATCCGCTGCAAGCTGCTCAAATCTCGG
 CAGACACCTGAGGGTGAGTTTCTACCCCTTGACCAACTTGAAGTGGATGTAGGTTTTAGTACAGG
 GGCAGATCAACTTTTTCTTGTGTCCCCTCTCACCATTTGCCACGTGATCGATGCCAAAAGCCCCTT
 TTATGACCTATCCCAGCGAAGCATGCAAACCTGAACAGTTTCGAGGTGGTTCGTCATCCTGGAAGGCA
 TCGTGGAAACCACAGGGATGACTTGTCAAGCTCGAACATCATAACCCGAAGATGAAGTTCTTTGG
 GGTTCATCGTTTTTCCCTGTAATTTCTTTAGAAGAAGGATTCTTTAAAGTCGATTACTCCCAGTTCC
 ATGCAACCTTTGAAGTCCCCACCCCTCCGTACAGTGTGAAAGAGCAGGAAGAAATGCTTCTCATG
 TCTTCCCCTTTAATAGCACCCAGCCATAACCAACAGCAAAGAAAGACACAATTCTGTGGAGTGCTTA
 GATGGACTAGATGACATTAGCACAAAACCTCCATCGAAGCTGCAGAAAATTACGGGGAGAGAAGA
 CTTTCCCAAAAACTCCTGAGGATGAGTTCTACAACCTTCAGAAAAAGCCTATAGTTTGGGTGATTT
 GCCCATGAAACTCCAACGAATAAGTTTCGGTTCCTGGCAACTCTGAAGAAAAACTGGTATCTAAAA
 CCACCAAGATGTTATCAGATCCCATGAGCCAGTCTGTGGCCGATTTGCCACCGAAGCTTCAAAG
 ATGGCTGGAGGACCTACCAGGATGGAAGGGAATCTTCCAGCCAAACTAAGAAAAATGAAGTCTGA
 CCGCTTACATAG

Basensequenz des Kir3.2h (GIRK2)

ATGGCCAAGCTGACAGAATCCATGACTAACGTCCTGGAGGGCGACTCCATGGATCAGGACGTGC
AAAGCCCAGTGGCCATTACCAGCCAAAGTTGCCTAAGCAGGCCAGGGATGACCTGCCAAGACA
CATCAGCCGAGATCGGACCAAAGGAAAATCCAGAGGTACGTGAGGAAAGACGGAAAGTGCAAT
GTTTCATCACGGCAACGTGAGGGAGACCTATCGCTACCTGACCGATATCTTCACCACATTAGTGA
CCTGAAGTGGAGATTCAACCTATTGATTTTTGTCATGGTTTACACAGTGACCTGGCTCTTTTTGG
AATGATCTGGTGGTTGATCGCATACATACGGGGAGACATGGACCACATAGAGGACCCCTCCTGG
ACTCCTTGTGTTACCAACCTCAACGGGTTTCGTCTCTGCTTTTTTATTCTCAATAGAGACAGAAACC
ACCATTGGTTATGGCTACCGGGTTCATCACAGATAAATGCCCGGAGGGAATTATTCTTCTCTTAATC
CAATCTGTGTTGGGGTCCATTGTCAATGCATTTCATGGTGGGATGCATGTTTGTAAAAATCTCTCAA
CCCAAGAAGAGGGCAGAGACCCTGGTCTTTTTCCACCCATGCAGTGATCTCCATGCGGGATGGGA
AACTGTGCCTGATGTTCCGGGTAGGGGACCTTAGGAATCCACATTGTGGAGGCTTCCATCAGA
GCCAAGTTGATCAAATCAAACAGACCTCGGAGGGGGAGTTCATCCCGTTGAACCAGACGGATA
TCAACGTAGGGTATTACACGGGGGATGACCGTCTGTTTCTGGTGTACCGCTGATCATTAGCCAT
GAAATTAACCAACAGAGTCTTTCTGGGAGATCTCAAAGCCAGCTGCCCAAAGAGGAAGTGG
AATTGTGGTTCATCCTAGAAGGAATGGTGGAAAGCCACAGGGATGACATGCCAAGCTCGAAGCTCC
TACATCACCAAGTGCATACACAGCTTCCATGAGACCTATGAGACCAGCACCCCATCCCTTAGTGCC
AAAGAGCTGGCCGAGTTAGCCAGCAGGGCAGAGCTGCCCTGAGTTGGTCTGTATCCAGCAAAC
TCAACCAACATGCAGAACTGGAGACTGAAGAGGAAGAAAAGAACCCTCGAAGAGCAAACAGAAAG
AAATGGTGTATGGCAAACCTGGAGAATGAATCCAAAGTTTAG

Basensequenz des hSlo1 (MaxiK)

ATGGATGCGCTCATCATCCCGGTGACCATGGAGGTGCCGTGCGACAGCCGGGGCCAACGCATG
TGGTGGGCTTTCTGACCCTCCATGGTGACTTTCTTCGGGGCCTCTTCATCATCTTGCTCTG
GCGGACGCTCAAGTACCTGTGGACCGTGTGCTGCCACTGCGGGGGCAAGACGAAGGAGGCCCA
GAAGATTAACAATGGCTCAAGCCAGGCGGATGGCACTCTCAAACCAGTGGATGAAAAAGAGGAG
GCAGTGGCCGCCGAGGTGGCTGGATGACCTCCGTGAAGGACTGGGCGGGGGTGTATGATATCC
GCCAGACACTGACTGGCAGAGTCTGGTTGTCTTAGTCTTTGCTCTCAGCATCGGTGCACTTGT
AATATACTTCATAGATTCATCAAACCAATAGAATCCTGCCAGAATTTCTACAAAGATTTACATTA
CAGATCGACATGGCTTTCAACGTGTTCTTCTCTACTTTGGCTTGGGTTTATTGCAGCCAAC
GATAAATTGTGGTTCTGGCTGGAAGTGAACCTCTGTAGTGGATTTCTTCACGGTGCCCCCGTGT
TGTGTCTGTGTACTTAAACAGAAGTTGGCTTGGTTTGAAGATTTTTAAGAGCTCTGAGACTGATACA
GTTTTTCAGAAATTTTGCAGTTTCTGAATATTCTTAAAACAAGTAATTCCATCAAGCTGGTGAATCTG
CTCTCCATATTTATCAGCACGTGGCTGACTGCAGCCGGTTCATCCATTTGGTGGAGAATTCAGG
GGACCCATGGGAAAATTTCCAAAACAACCAGGCTCTCACCTACTGGGAATGTGTCTATTTACTCAT
GGTCACAATGTCCACCGTTGGTTATGGGGATGTTTATGCAAAAACCACACTTGGGCGCCTCTTCA
TGGTCTTCTTCATCCTCGGGGGACTGGCCATGTTTGCCAGCTACGTCCCTGAAATCATAGAGTTA
ATAGGAAACC GCAAGAAATACGGGGGCTCCTATAGTGGGTTAGTGGAAAGAAAGCACATTGTGG
TCTGCGGACACATCACTCTGGAGAGTGTTCCAAACCTTCTGAAGGACTTTCTGCACAAGGACCGG
GATGACGTCAATGTGGAGATCGTTTTTCTTCAACATCTCCCCAACCTGGAGCTTGAAGCTCT
GTTCAAACGACATTTTACTCAGGTGGAATTTTATCAGGGTTCCGTCTCAATCCACATGATCTTGC
AAGAGTCAAGATAGAGTCAGCAGATGCATGCCTGATCCTTGCCAACAAGTACTGCGCTGACCCG
GATGCGGAGGATGCCTCGAATATCATGAGAGTAATCTCCATAAAGAAGTACTCCGAGCTGGAATT
AATCATCACTCAAATGCTGCAGTATCACAACAAGGCCCATCTGCTAAACATCCCGAGCTGGAATT
GAAAGAAGGTGATGACGCAATCTGCCTCGCAGAGTTGAAGTTGGGCTTCATAGCCAGAGCTG
CCTGGCTCAAGGCCTCTCCACCATGCTTGCCAACCTCTTCTCCATGAGGTCATTCATAAAGATTG
AGGAAGACACATGGCAGAAATACTACTTGGAAAGGAGTCTCAAATGAAATGTACACAGAATATCTC
TCCAGTGCTTTCGTGGGTCTGTCTTCCCTACTGTTTGTGAGCTGTGTTTTGTGAAGCTCAAGCT
CCTAATGATAGCCATTGAGTACAAGTCTGCCAACCGAGAGAGCCGTATATTAATTAATCCTGGAAA
CCATCTTAAGATCCAAGAAGGTACTTTAGGATTTTTTATCGCAAGTGATGCCAAAGAAGTTAAAAG
GGCATTTTTTTACTGCAAGGCCTGTGATGATGACATCACAGATCCCAAAGAATAAAAAAATGTGG
CTGCAAACGGCTTGAAGATGAGCAGCCGTCAACACTATCACCAAAAAAAGCAACGGGAATGGA
GGCATGCGGAACACCCAACACCTCGCCTAAGCTGATGAGGCATGACCCCTTGTTAATTCCTG
GCAATGATCAGATTGACAACATGGACTCCAATGTGAAGAAGTACGACTCTACTGGGATGTTTCAC
TGGTGTGCACCCAAGGAGATAGAGAAAGTCATCCTGACTCGAAGTGAAGCTGCCATGACCGTCC
TGAGTGGCCATGTCGTGGTCTGCATCTTTGGCGACGTCAGCTCAGCCCTGATCGGCCTCCGGAA
CCTGGTGTATGCCGCTCCGTGCCAGCAACTTTCATTACCATGAGCTCAAGCACATTGTGTTTGTGG

GCTCTATTGAGTACCTCAAGCGGGAATGGGAGACGCTTCATAACTTCCCCAAAGTGTCCATATTG
 CCTGGTACGCCATTAAGTCGGGCTGATTTAAGGGCTGTCAACATCAACCTCTGTGACATGTGCGT
 TATCCTGTCAGCCAATCAGAATAATATTGATGATACTTCGCTGCAGGACAAGGAATGCATCTTGCC
 GTCACCTCAACATCAAACTATGCAGTTTGATGACAGCATCGGAGTCTTGCAGGCTAATTCCCAAG
 GGTTACACCTCCAGGAATGGATAGATCCTCTCCAGATAACAGCCCAGTGCACGGGATGTTACGT
 CAACCATCCATCACAACCTGGGGTCAACATCCCCATCATCACTGAACTAGTGAACGATACTAATGTT
 CAGTTTTTGGACCAAGACGATGATGATGACCCTGATACAGAACTGTACCTCACGCAGCCCTTTGC
 CTGTGGGACAGCATTGCGCTCAGTGTCTGACTCACTCATGAGCGCGACGTACTTCAATGACA
 ATATCCTCACCCCTGATACGGACCCTGGTGACCGGAGGAGCCACGCCGGAGCTGGAGGCTCTGA
 TTGCTGAGGAAAACGCCCTTAGAGGTGGCTACAGCACCCCGCAGACACTGGCCAATAGGGACCG
 CTGCCGCGTGGCCAGTTAGCTCTGCTCGATGGCCATTTGCGGACTTAGGGGATGGTGGTTGT
 TATGGTGATCTGTTCTGCAAAGCTCTGAAAACATATAATATGCTTTGTTTTGGAATTTACCGGCTG
 AGAGATGCTCACCTCACCCCCAGTCAGTGCACAAAAGAGGTATGTCATCACCAACCCGCCCT
 ATGAGTTTGGAGCTCGTGCCGACGGACCTGATCTTCTGCTTAATGCAGTTTACCACAATGCCGGC
 CAGTCCCAGGGCCAGCCTGTCCCATTCTCCACTCGTCGCAGTCTCCAGCAAGAAGAGCTCCT
 CTGTTCACTCCATCCATCCACAGCAAACCGACAGAACCGGCCAAGTCCAGGGAGTCCCGGGA
 CAAACAGAAGTACGTGCAGGAAGAGCGGCTTTGAT

7.3 Gensequenzen der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte

Basensequenz des Kir2.1 (L222I)

Gelb dargestellt ist die Punktmutation L222I.

ATGGGCAGTGTGAGAACCAACCGCTACAGCATCGTCTCTTCGGAGGAAGACGGCATGAAGCTGG
 CCACCATGGCCGTCGCCAATGGCTTTGGGAATGGCAAGAGTAAAGTCCATACCCGACAACAGTG
 CAGGAGCCGCTTTGTGAAGAAAGACGGGCATTGCAACGTTTCAGTTTATCAACGTGGGAGAGAAA
 GGACAGAGGTACCTGGCGGACATCTTACTACCTGTGTGGACATCCGCTGGCGGTGGATGCTGG
 TAATCTTCTGCCTCGCATTCTGTCTCTCCTGGCTGTTCTTTGGCTGTGTGTTTTGGTTGATAGCTC
 TGCTCCACGGGGATCTGGATGCTTCTAAAGAGAGCAAAGCGTGTGTGTCTGAGGTCAACAGCTT
 CACGGCTGCCTTCTCTTCTCCATTGAGACCCAGACAACCATCGGCTATGGTTTCAGGTGTGTTA
 CAGACGAGTGCCCGATTGCTGTTTTCATGGTGGTATTCCAGTCAATCGTGGGCTGCATCATCGAC
 GCCTTCATCATTGGTGCAGTCAATGGCGAAGATGGCGAAGCCAAAGAAGAGGAATGAGACTCTGG
 TCTTCAGCCACAACGCTGTGATTGCCATGAGGGACGGCAAACCTCTGCTTGTGGAGAGTGGG
 CAACCTTCGCAAGAGCCACATTGTGGAAAGCTCATGTCCGGGCACAGCTTCTCAAATCTAGGATCA
 CTTCAGAAGGGGAGTACATCCCCTTGGACCAGATAGACATCAACGTTGGTTTCGATAGCGGAATC
 GACCGTATATTTCTAGTGTCCCAATCACTATTGTCCATGAAATAGACGAAGACAGCCCTTTGTAT
 GACTTGAGTAAGCAGGACATTGACAATGCAGACTTTGAAATCGTTGTCATCCTGGAAGGCATGGT
 GGAGGCCACTGCCATGACAACGCAATGCCGGAGTTCATATCTGGCCAATGAGATTCTCTGGGGT
 CACCGCTACGAGCCGGTGTCTTTGAAGAGAAGCATTGCTATAAAGTAGACTATTCAAGATTCCA
 TAAGACTTACGAAGTACCTAACACTCCCCTTTGTAGTGCCAGAGACTTAGCAGAGAAGAAATACAT
 CCTCTCAAATGCAAATTCATTTTGTATGAAAATGAAGTTGCCCTAACAAAGCAAAGAGGAAGAGGA
 CAGTGAGAACGGAGTTCCAGAGAGCACAAGTACGGACTCACCTCCTGGCATAGATCTCCACAAC
 CAGGCGAGCGTGCCTCTAGAGCCCAGGCCTTTAAGGCGAGAATCGGAGATATGA

Basensequenz des Kir3.2 (I232L)

Gelb dargestellt ist die Punktmutation I232L.

ATGGCCAAGCTGACAGAATCCATGACTAACGTCCTGGAGGGCGACTCCATGGATCAGGACGTGCG
 AAAGCCCAGTGGCCATTCACCAGCCAAAGTTGCCTAAGCAGGCCAGGGATGACCTGCCAAGACA
 CATCAGCCGAGATCGGACCAAAGGAAAATCCAGAGGTACGTGAGGAAAGACGGAAAGTGCAAT
 GTTCATCACGGCAACGTGAGGGAGACCTATCGCTACCTGACCGATATCTTACCACATTAGTGA
 CCTGAAGTGGAGATTCAACCTATTGATTTTTGTCATGGTTTACACAGTGACCTGGCTCTTTTTTGG
 AATGATCTGGTGGTTGATCGCATACATACGGGGAGACATGGACCACATAGAGGACCCCTCCTGG
 ACTCCTTGTGTTACCAACCTCAACGGGTTCTGCTCTGCTTTTTTATTCTCAATAGAGACAGAAACC

ACCATTGGTTATGGCTACCGGGTTCATCACAGATAAATGCCCGGAGGGAATTATTCTTCTCTTAATC
 CAATCTGTGTTGGGGTCCATTGTCAATGCATTTCATGGTGGGATGCATGTTTGTAAAAATCTCTCAA
 CCAAGAAGAGGGCAGAGACCCTGGTCTTTTCCACCCATGCAGTGATCTCCATGCGGGATGGGA
 AACTGTGCCTGATGTTCCGGGTAGGGGACCTTAGGAATCCAC**CTG**GTGGAGGCTTCCATCAG
 AGCCAAGTTGATCAAAACAGACCTCGGAGGGGGAGTTTCATCCCGTTGAACCAGACGGAT
 ATCAACGTAGGGTATTACACGGGGGATGACCGTCTGTTTCTGGTGTACCCGCTGATCATTAGCCA
 TGAATTAACCAACAGAGTCCTTTCTGGGAGATCTCAAAGCCCAGCTGCCAAAGAGGAACTGG
 AAATTGGTTCATCCTAGAAGGAATGGTGGAAAGCCACAGGGATGACATGCCAAGCTCGAAGCTC
 CTACATCACCAGTGAGATCCTGTGGGGTACCAGGTTACACCTGTCTGACCCTGGAGGACGGG
 TTCTACGAAGTTGACTACAACAGCTTCCATGAGACCTATGAGACCAGCACCCCATCCCTTAGTGC
 CAAAGAGCTGGCCGAGTTAGCCAGCAGGGCAGAGCTGCCCTGAGTTGGTCTGTATCCAGCAAA
 CTAACCAACATGCAGAACTGGAGACTGAAGAGGAAGAAAAGAACCTCGAAGAGCAAACAGAAA
 GAAATGGTGATGTGGCAAACCTGGAGAATGAATCCAAAGTTTAG

Basensequenz des Kir3.1_{Kir2.1-PIP}

Gelb dargestellt ist die PIP₂-Sequenz des Kir2.1, die die PIP₂-Sequenz des Kir3.1 ersetzt, rot markiert ist eine „silent Mutation“.

ATGTCTGCACTCCGAAGGAAATTTGGGGACGATTACCAGGTAGTGACCACTTCGTCCAGCGGTTCC
 GGGCTTGACGCCCCAGGGGCCAGGACAGGGCCCACAGCAGCAGCTTGTACCCAAGAAGAAACG
 GCAGCGGTTTCGTGGACAAGAACGGTCGGTGAATGTGCAGCACGGCAACCTGGGCAGCGAGAC
 CAGTCGTACTTTCCGACCTCTTCACTACCCTGGTGGATCTCAAGTGCCGTTGGAACCTCTTTA
 TCTTCATCCTCACCTACACCTGGCCTGGCTCTTTCATGGCGTCCATGTGGTGGGTGATCGCTTAT
 ACCCGGGGGCAGCTGAACAAAGCCCATGTCGGCAACTACACTCCCTGTGTGGCCAATGTCTATA
 ACTTCCCCTCTGCCTTCTTTTCTTCATCGAGACCGAGGCCACCATCGGCTATGGCTACCGCTAC
 ATCACCGACAAGTGCCCCGAGGGCATCATCCTTTTCTTTTCCAGTCCATCCTTGGCTCCATCGT
 GGACGCTTTCCTCATCGGCTGCATGTTTCATCAAGATGTCCAGCCAAAAAGCGCGCCGAGACC
 CTCATGTTTAGCGAGCATGCGGTTATTTCCATGAGGGACGGAAAACT**CTGCTTGATGTGGAGAGT**
GGGCAACCTTCGCAAGAGCCACCTTGTGGAAGCTCATGTCCGGGCACAGCTTCTCAAATCTAGG
ATCACTTCAGAAGGGGAGTACATCCCCTTGGACCAACTTGAAGTGGATGTAGGTTTTAGTACAGG
 GGCAGATCAACTTTTTCTTGTGTCCCCTCTCACCATTTGCCACGTGATCGATGCCAAAAGCCCCTT
 TTATGACCTATCCCAGCGAAGCATGCAAACTGAACAGTTCGAGGTGGTTCGTCATCCTGGAAGGCA
 TCGTGGAAACCACAGGGATGACTTGTCAAGCTCGAACATCATAACCCGAAGATGAAGTTCTTTGG
 GGTCATCGTTTTTCCCTGTAATTTCTTTAGAAGAAGGATTCTTTAAAGTCGATTACTCCCAGTTCC
 ATGCAACCTTTGAAGTCCCCACCCCTCCGTACAGTGTGAAAGAGCAGGAAGAAATGCTTCTCATG
 TCTTCCCCTTTAATAGCACCCAGCCATAACCAACAGCAAAGAAAGACACAATTCTGTGGAGTGCTTA
 GATGGACTAGATGACATTAGCACAAAACCTTCCATCGAAGCTGCAGAAAATTACGGGGGAGAGAAGA
 CTTTCCAAAAAACTCCTGAGGATGAGTTCTACAACCTCAGAAAAAGCCTATAGTTTGGGTGATTT
 GCCCATGAAACTCCAACGAATAAGTTCGGTTCCTGGCAACTCTGAAGAAAAAC**GG**TATCTAAAA
 CCACCAAGATGTTATCAGATCCCATGAGCCAGTCTGTGGCCGATTTGCCACCGAAGCTTCAAAG
 ATGGCTGGAGGACCTACCAGGATGGAAGGGAATCTTCCAGCCAAACTAAGAAAAATGAAGTCTGA
 CCGCTTACATAG

Basensequenz des Kir3.2_{Kir2.1-PIP}

Gelb dargestellt ist die PIP₂-Sequenz des Kir2.1, die die PIP₂-Sequenz des Kir3.2 ersetzt.

ATGGCCAAGCTGACAGAATCCATGACTAACGTCCTGGAGGGCGACTCCATGGATCAGGACGTCCG
 AAAGCCCAGTGGCCATTCACCAGCCAAAGTTGCCTAAGCAGGCCAGGGATGACCTGCCAAGACA
 CATCAGCCGAGATCGGACCAAAGGAAAATCCAGAGGTACGTGAGGAAAGACGGAAAGTGCAAT
 GTTCATCACGGCAACGTGAGGGGAGACCTATCGCTACCTGACCGATATCTTACCACATTAGTGA
 CCTGAAGTGGAGATTCAACCTATTGATTTTTGTCATGGTTTACACAGTGACCTGGCTCTTTTTTGG
 AATGATCTGGTGGTTGATCGCATAACATACGGGGGAGACATGGACCACATAGAGGACCCCTCCTGG
 ACTCCTTGTGTTACCAACCTCAACGGGTTTCGTCTCTGCTTTTTTATTCTCAATAGAGACAGAAACC
 ACCATTGGTTATGGCTACCGGGTTCATCACAGATAAATGCCCGGAGGGAATATTCTTCTCTTAATC
 CAATCTGTGTTGGGTCATTGTCATTCATGTTGTTGCGGATGCATGTTTGTAAAAATCTCTCAA
 CCAAGAAGAGGGCAGAGACCCTGGTCTTTTCCACCCATGCAGTGATCTCCATGCGGGATGGGA
AACTCTGCTTGATGTGGAGAGTGGGCAACCTTCGCAAGAGCCACCTTGTGGAAGCTCATGTCCG

GGCACAGCTTCTCAAATCTAGGATCACTTCAGAAGGGGAGTACATCCCCTTG AACCAGACGGATA
 TCAACGTAGGGTATTACACGGGGGATGACCGTCTGTTTCTGGTGTACCGCTGATCATTAGCCAT
 GAAATTAACCAACAGAGTCTTTTCTGGGAGATCTCCAAGCCAGCTGCCAAAGAGGAACTGGA
 AATTGTGGTCATCCTAGAAGGAATGGTGGAAGCCACAGGGATGACATGCCAAGCTCGAAGCTCC
 TACATCACCAGTGAGATCCTGTGGGGTTACCGGTTACACACCTGTCTGACCCTGGAGGACGGGT
 TCTACGAAGTTGACTACAACAGCTTCCATGAGACCTATGAGACCAGCACCCCATCCCTTAGTGCC
 AAAGAGCTGGCCGAGTTAGCCAGCAGGGCAGAGCTGCCCTGAGTTGGTCTGTATCCAGCAAAC
 TCAACCAACATGCAGAACTGGAGACTGAAGAGGAAGAAAAGAACCCTCGAAGAGCAAACAGAAAG
 AAATGGTGTATGGCAAACCTGGAGAATGAATCCAAAGTTTAG

Kir3.1_{G431}

ATGTCTGCACTCCGAAGGAAATTTGGGGACGATTACCAGGTAGTGACCACTTCGTCCAGCGGTTCC
 GGGCTTGCAGCCCCAGGGGCCAGGACAGGGCCCACAGCAGCAGCTTGTACCCAAGAAGAAACG
 GCAGCGGTTTCGTGGACAAGAACGGTCCGGTGAATGTGCAGCACGGCAACCTGGGCAGCGAGAC
 CAGTCGCTACCTTTCCGACCTCTTCACTACCCTGGTGGATCTCAAGTGCGCTTGAACCTCTTTA
 TCTTCATCCTCACCTACACCGTGGCCTGGCTCTTCATGGCGTCCATGTGGTGGGTGATCGCTTAT
 ACCCGGGGCGACCTGAACAAAGCCCATGTCCGCAACTACACTCCCTGTGTGGCCAATGTCTATA
 ACTTCCCCTCTGCCTTCTTTTCTTCATCGAGACCGAGGCCACCATCGGCTATGGCTACCGCTAC
 ATCACCGACAAGTGCCCCGAGGGCATCATCCTTTTCTTTTCCAGTCCATCCTTGGCTCCATCGT
 GGACGCTTTCCTCATCGGCTGCATGTTTCATCAAGATGTCCAGCCAAAAAGCGCGCCGAGACC
 CTCATGTTTAGCGAGCATGCGGTTATTTCCATGAGGGACGGAAAACACTACTCTCATGTTCCGGGT
 GGGCAACCTGCGCAACAGCCACATGGTCTCCGCGCAGATCCGCTGCAAGCTGCTCAAATCTCGG
 CAGACACCTGAGGGTGAGTTTCTACCCCTTGACCAACTGAACTGGATGTAGGTTTTAGTACAGG
 GGCAGATCAACTTTTTCTTGTGTCCCCTCTCACCATTTGCCACGTGATCGATGCCAAAAGCCCCTT
 TTATGACCTATCCAGCGAAGCATGCAAACTGAACAGTTCGAGGTGGTTCGTCATCCTGGAAGGCA
 TCGTGGAACCACAGGGATGACTTGTCAAGCTCGAACATCATAACCCGAAGATGAAGTTCTTTGG
 GGTCATCGTTTTTCCCTGTAATTTCTTTAGAAGAAGGATTCTTTAAAGTCGATTACTCCCAGTTCC
 ATGCAACCTTTGAAGTCCCCACCCCTCCGTACAGTGTGAAAGAGCAGGAAGAAATGCTTCTCATG
 TCTTCCCCTTTAATAGCACCCAGCCATAACCAACAGCAAAGAAAGACACAATTCTGTGGAGTGCTTA
 GATGGACTAGATGACATTAGCACAAAACCTTCATCGAAGCTGCAGAAAATTACGGGGGAGAGAAGA
 CTTTCCCAAAAAACTCCTGAGGATGAGTTCTACAACCTCAGAAAAAGCCTATAGTTTGGT

Kir3.1_{C179 V179}Kir2.1

ATGTCTGCACTCCGAAGGAAATTTGGGGACGATTACCAGGTAGTGACCACTTCGTCCAGCGGTTCC
 GGGCTTGCAGCCCCAGGGGCCAGGACAGGGCCCACAGCAGCAGCTTGTACCCAAGAAGAAACG
 GCAGCGGTTTCGTGGACAAGAACGGTCCGGTGAATGTGCAGCACGGCAACCTGGGCAGCGAGAC
 CAGTCGCTACCTTTCCGACCTCTTCACTACCCTGGTGGATCTCAAGTGCGCTTGAACCTCTTTA
 TCTTCATCCTCACCTACACCGTGGCCTGGCTCTTCATGGCGTCCATGTGGTGGGTGATCGCTTAT
 ACCCGGGGCGACCTGAACAAAGCCCATGTCCGCAACTACACTCCCTGTGTGGCCAATGTCTATA
 ACTTCCCCTCTGCCTTCTTTTCTTCATCGAGACCGAGGCCACCATCGGCTATGGCTACCGCTAC
 ATCACCGACAAGTGCCCCGAGGGCATCATCCTTTTCTTTTCCAGTCCATCCTTGGCTCCATCGT
 GGACGCTTTCCTCATCGGCTGC
 GTCATGGCGAAGATGGCGAAGCCAAAGAAGAGGAATGAGACTCTGGTCTTCAGCCACAACGCTG
 TGATTGCCATGAGGGACGGCAAACCTCTGCTTGATGTGGAGAGTGGGCAACCTTCGCAAGAGCCA
 CTTTGTGGAAGCTCATGTCCGGGCACAGCTTCTCAAATCTAGGATCACTTCAGAAGGGGAGTACA
 TCCCCTTGACCAGATAGACATCAACGTTGGTTTCGATAGCGGAATCGACCGTATATTTCTAGTG
 TCCCAATCACTATTGTCCATGAAATAGACGAAGACAGCCCTTTGTATGACTTGAGTAAGCAGGA
 CATTGACAATGCAGACTTTGAAATCGTTGTCATCCTGGAAGGCATGGTGGAGGCCACTGCCATGA
 CAACGCAATGCCGGAGTTCATATCTGGCCAATGAGATTCTCTGGGGTACCGCTACGAGCCGGT
 GCTCTTTGAAGAGAAGCATTGCTATAAAGTAGACTATTCAAGATTCCATAAGACTTACGAAGTACC
 TAACACTCCCCTTTGTAGTGCCAGAGACTTAGCAGAGAAGAAATACATCCTCTCAAATGCAAATTC
 ATTTTGTATGAAAATGAAGTTGCCCTAACAAGCAAAGAGGAAGAGGACAGTGAGAACGGAGTTC
 CAGAGAGCACAAAGTACGGACTCACCTCCTGGCATAGATCTCCACAACCAGGCGAGCGTGCCTCT
 AGAGCCCAGGCCCTTAAGGCGAGAATCGGAGATATAG

Kir3.2_{C188 V179}Kir2.1

Rot markiert ist eine „silent Mutation“.

ATGGCCAAGCTGACAGAATCCATGACTAACGTCCTGGAGGGCGACTCCATGGATCAGGACGTCG
AAAGCCCAGTGGCCATTCACCAGCCAAAGTTGCCTAAGCAGGCCAGGGATGACCTGCCAAGACA
CATCAGCCGAGATCGGACCAAAGGAAAATCCAGAGGTACGTGAGGAAAGACGGAAAGTGCAAT
GTTTCATCACGGCAACGTGAGGGAGACCTATCGCTACCTGACCGATATCTTCACCACATTAGTGGA
CCTGAAGTGGAGATTCAACCTATTGATTTTTGTCATGGTTTACACAGTGACCTGGCTCTTTTTGG
AATGATCTGGTGGTTGATCGCATAACATACGGGGAGACATGGACCACATAGAGGACCCCTCCTGG
ACTCCTTGTGTTACCAACCTCAACGGGTTTCGTCTCTGCTTTTTTATTCTCAATAGAGACAGAAACC
ACCATTGGTTATGGCTACCGGGTTCATCACAGATAAATGCCCGGAGGGAATTATTCTTCTCTTAATC
CAATCTGTGTTGGGGTCCATTGTCAATGCATTCATGGTGGGATGC
GTCATGGCGAAGATGGCGAAGCCAAAGAAGAGGAATGAGACTCTGGTCTTCAGCCACAACGCTG
TGATTGCCATGAGGGACGGCAAACCTCTGCTTGATGTGGAGAGTGGGCAACCTTCGCAAGAGCCA
CCTTGTGGAAGCTCATGTCCGGGCACAGCTTCTCAAATCTAGGATCACTTCAGAAGGGGAGTACA
TCCCCTTGGACCAGATAGACATCAACGTTGGTTTCGATAGCGGAATCGACCGTATATTTCTAGTG
TCCCAATCACTATTGTCCATGAAATAGACGAAGACAGCCCTTTGTATGACTTGAGTAAGCAGGA
CATTGACAATGCAGACTTTGAAATCGTTGTCATCCTGGAAGGCATGGTGGAGGCCACTGCCATGA
CAACGCAATGCCGGAGTTCATATCTGGCCAATGAGATTCTCTGGGGTACCGCTACGAGCCGGT
GCTCTTTGAAGAGAAGCATTGCTATAAAGTAGACTATTCAAGATTCCATAAGACTTACGAAGTACC
TAACACTCCCCTTTGTAGTGCCAGAGACTTAGCAGAGAAGAAATACATCCTCTCAAATGCAAATTC
ATTTTGCTATGAAAATGAAGTTGCCCTAACAGCAAAGAGGAAAGAGGACAGTGAGAACGGAGTTC
CAGAGAGCACAAGTACGGACTCACCTCCTGGCATAGATCTCCACAACCAGGCGAGCGTGCCCT
AGAGCCCAGGCCTTTAAGGCGAGAATCGGAGATATAG

Kir2.1_{Y326 F328}Kir3.1

ATGGGCAGTGTGAGAACCAACCGCTACAGCATCGTCTCTTCGGAGGAAGACGGCATGAAGCTGG
CCACCATGGCCGTCGCCAATGGCTTTGGGAATGGCAAGAGTAAAGTCCATACCCGACAACAGTG
CAGGAGCCGCTTTGTGAAGAAAGACGGGCATTGCAACGTTTCAGTTTATCAACGTGGGAGAGAAA
GGACAGAGGTACCTGGCGGACATCTTACTACCTGTGTGGACATCCGCTGGCGGTGGATGCTGG
TAATCTTCTGCCTCGCATTCTGTGCTCTCCTGGCTGTTCTTTGGCTGTGTGTTTTGGTTGATAGCTC
TGCTCCACGGGGATCTGGATGCTTCTAAAGAGAGCAAAGCGTGTGTGTCTGAGGTCAACAGCTT
CACGGCTGCCTTCTCTTCTCCATTGAGACCCAGACAACCATCGGCTATGGTTTTAGGTGTGTTA
CAGACGAGTGCCCGATTGCTGTTTTCATGGTGGTATTCCAGTCAATCGTGGGCTGCATCATCGAC
GCCTTCATCATTGGTGCAGTCATGGCGAAGATGGCGAAGCCAAAGAAGAGGAATGAGACTCTGG
TCTTCAGCCACAACGCTGTGATTGCCATGAGGGACGGCAAACCTCTGCTTGATGTGGAGAGTGGG
CAACCTTCGCAAGAGCCACCTTGTGGAAGCTCATGTCCGGGCACAGCTTCTCAAATCTAGGATCA
CTTCAGAAGGGGAGTACATCCCCTTGGACCAGATAGACATCAACGTTGGTTTTCGATAGCGGAATC
GACCGTATATTTCTAGTGTCCCAATCACTATTGTCCATGAAATAGACGAAGACAGCCCTTTGTAT
GACTTGAGTAAGCAGGACATTGACAATGAGACTTTGAAATCGTTGTCATCCTGGAAGGCATGGT
GGAGGCCACTGCCATGACAACGCAATGCCGGAGTTCATATCTGGCCAATGAGATTCTCTGGGGT
CACCGCTAC
TTCCCTGTAATTTCTTTAGAAGAAGGATTCTTTAAAGTTCGATTACTCCCAGTTCCATGCAACCTTTG
AAGTCCCCACCCCTCCGTACAGTGTGAAAGAGCAGGAAGAAATGCTTCTCATGTCTTCCCCTTTA
ATAGCACCAGCCATAACCAACAGCAAAGAAAGACACAATTCTGTGGAGTGCTTAGATGGACTAGA
TGACATTAGCACAAAACCTCCATCGAAGCTGCAGAAAATTACGGGGAGAGAAGACTTTCCAAAA
AACTCCTGAGGATGAGTTCTACAACCTCAGAAAAAGCCTATAGTTTGGGTGATTTGCCATGAAAC
TCCAACGAATAAGTTCCGTTCTGGCAACTCTGAAGAAAAACTGGTATCTAAAACCACCAAGATGT
TATCAGATCCCATGAGCCAGTCTGTGGCCGATTTGCCACCGAAGCTTCAAAGATGGCTGGAGG
ACCTACCAGGATGGAAGGGAATCTTCCAGCCAAACTAAGAAAAATGAACTCTGACCGCTTCACAT
AG

Kir2.1_{Y326 F337}Kir3.2

ATGGGCAGTGTGAGAACCAACCGCTACAGCATCGTCTCTTCGGAGGAAGACGGCATGAAGCTGG
CCACCATGGCCGTCGCCAATGGCTTTGGGAATGGCAAGAGTAAAGTCCATACCCGACAACAGTG
CAGGAGCCGCTTTGTGAAGAAAGACGGGCATTGCAACGTTTCAGTTTATCAACGTGGGAGAGAAA

GGACAGAGGTACCTGGCGGACATCTTTACTACCTGTGTGGACATCCGCTGGCGGTGGATGCTGG
 TAATCTTCTGCCTCGCATTCTGTGCTCTCCTGGCTGTTCTTTGGCTGTGTGTTTTGGTTGATAGCTC
 TGCTCCACGGGGATCTGGATGCTTCTAAAGAGAGCAAAGCGTGTGTGTCTGAGGTCAACAGCTT
 CACGGCTGCCTTCTCTTCTCCATTGAGACCCAGACAACCATCGGCTATGGTTTTAGGTGTGTTA
 CAGACGAGTGCCCGATTGCTGTTTTTCATGGTGGTATTCCAGTCAATCGTGGGCTGCATCATCGAC
 GCCTTCATCATTGGTGCAGTCATGGCGAAGATGGCGAAGCCAAAGAAGAGGAATGAGACTCTGG
 TCTTCAGCCACAACGCTGTGATTGCCATGAGGGACGGCAAACCTCTGCTTGATGTGGAGAGTGGG
 CAACCTTCGCAAGAGCCACCTTGTGGAAGCTCATGTCCGGGCACAGCTTCTCAAATCTAGGATCA
 CTTTCAAGAGGGGAGTACATCCCCTTGGACCAGATAGACATCAACGTTGGTTTTGATAGCGGAATC
 GACCGTATATTTCTAGTGTCCCAATCACTATTGCCATGAAATAGACGAAGACAGCCCTTTGTAT
 GACTTGAGTAAGCAGGACATTGACAATGCAGACTTTGAAATCGTTGTCATCCTGGAAGGCATGGT
 GGAGGCCACTGCCATGACAACGCAATGCCGGAGTTCATATCTGGCCAATGAGATTCTCTGGGGT
 CACCGCTAC
 ACACCTGTCTGACCCTGGAGGACGGGTTCTACGAAGTTGACTACAACAGCTTCCATGAGACCTA
 TGAGACCAGCACCCCATCCCTTAGTGCCAAAGAGCTGGCCGAGTTAGCCAGCAGGGCAGAGCT
 GCCCTGAGTTGGTCTGTATCCAGCAAACCTCAACCAACATGCAGAACTGGAGACTGAAGAGGAA
 GAAAAGAACCTCGAAGAGCAAACAGAAAGAAATGGTGTGTGGCAAACCTGGAGAATGAATCCAA
 AGTTTAG

MaxiK_{I322}

ATGGATGCGCTCATCATCCCGGTGACCATGGAGGTGCCGTGCGACAGCCGGGGCCAACGCATG
 TGGTGGGCTTTCTGGCCTCCTCCATGGTGAATTTCTTCGGGGGCCTCTTCATCATCTTGCTCTG
 GCGGACGCTCAAGTACCTGTGGACCGTGTGCTGCCACTGCGGGGGCAAGACGAAGGAGGCCCA
 GAAGATTAACAATGGCTCAAGCCAGGCGGATGGCACTCTCAAACAGTGGATGAAAAAGAGGAG
 GCAGTGGCCGCCGAGGTCCGGCTGGATGACCTCCGTGAAGGACTGGGCGGGGGTGTATGATATCC
 GCCCAGACACTGACTGGCAGAGTCCTGGTTGTCTTAGTCTTTGCTCTCAGCATCGGTGCACTTGT
 AATATACTTCATAGATTCATCAAACCAATAGAATCCTGCCAGAATTTCTACAAAGATTTACATTA
 CAGATCGACATGGCTTTCAACGTGTTCTTCTCTACTTTGGCTTGGGTTTATTGCAGCCAAC
 GATAAATTGTGTTCTGGCTGGAAGTGAACCTCTGTAGTGGATTTCTTCACGGTGCCCCCGTGT
 TGTGTCTGTGTACTTAAACAGAAGTTGGCTTGGTTTGGATTTTTAAGAGCTCTGAGACTGATACA
 GTTTTTCAGAAATTTTGCAGTTTCTGAATATTCTTAAAACAAGTAATTCCATCAAGCTGGTGAATCTG
 CTCTCCATATTTATCAGCACGTGGCTGACTGCAGCCGGGTTCCATCCATTTGGTGGAGAATTCAGG
 GGACCCATGGGAAAATTTCCAAAACAACCAGGCTCTCACCTACTGGGAATGTGTCTATTTACTCAT
 GGTCAAAATGTCCACCGTTGGTTATGGGGATGTTTATGCAAAAACCACACTTGGGCGCCTCTTCA
 TGGTCTTCTTCATCCTCGGGGGACTGGCCATGTTTGCCAGCTACGTCCCTGAAATC

MaxiK_{I322} +ER-Export-Sequenz

Gelb dargestellt ist die ER-Export-Sequenz die an den MaxiK_{I322} angehängt wurde.

ATGGATGCGCTCATCATCCCGGTGACCATGGAGGTGCCGTGCGACAGCCGGGGCCAACGCATG
 TGGTGGGCTTTCTGGCCTCCTCCATGGTGAATTTCTTCGGGGGCCTCTTCATCATCTTGCTCTG
 GCGGACGCTCAAGTACCTGTGGACCGTGTGCTGCCACTGCGGGGGCAAGACGAAGGAGGCCCA
 GAAGATTAACAATGGCTCAAGCCAGGCGGATGGCACTCTCAAACAGTGGATGAAAAAGAGGAG
 GCAGTGGCCGCCGAGGTCCGGCTGGATGACCTCCGTGAAGGACTGGGCGGGGGTGTATGATATCC
 GCCCAGACACTGACTGGCAGAGTCCTGGTTGTCTTAGTCTTTGCTCTCAGCATCGGTGCACTTGT
 AATATACTTCATAGATTCATCAAACCAATAGAATCCTGCCAGAATTTCTACAAAGATTTACATTA
 CAGATCGACATGGCTTTCAACGTGTTCTTCTCTACTTTGGCTTGGGTTTATTGCAGCCAAC
 GATAAATTGTGTTCTGGCTGGAAGTGAACCTCTGTAGTGGATTTCTTCACGGTGCCCCCGTGT
 TGTGTCTGTGTACTTAAACAGAAGTTGGCTTGGTTTGGATTTTTAAGAGCTCTGAGACTGATACA
 GTTTTTCAGAAATTTTGCAGTTTCTGAATATTCTTAAAACAAGTAATTCCATCAAGCTGGTGAATCTG
 CTCTCCATATTTATCAGCACGTGGCTGACTGCAGCCGGGTTCCATCCATTTGGTGGAGAATTCAGG
 GGACCCATGGGAAAATTTCCAAAACAACCAGGCTCTCACCTACTGGGAATGTGTCTATTTACTCAT
 GGTCAAAATGTCCACCGTTGGTTATGGGGATGTTTATGCAAAAACCACACTTGGGCGCCTCTTCA
 TGGTCTTCTTCATCCTCGGGGGACTGGCCATGTTTGCCAGCTACGTCCCTGAAATC **GACCTGATC**
TTCTGCCTG

MaxiK_{L360} +ER-Export-Sequenz

Gelb dargestellt ist die „ER-Export-Sequenz“ die an den MaxiK_{L360} angehängt wurde.

ATGGATGCGCTCATCATCCCGGTGACCATGGAGGTGCCGTGCGACAGCCGGGGCCAACGCATG
 TGGTGGGCTTTCTGGCCTCCTCCATGGTGACTTTCTTCGGGGGCCTCTTCATCATCTTGCTCTG
 GCGGACGCTCAAGTACCTGTGGACCGTGTGCTGCCACTGCGGGGGCAAGACGAAGGAGGCCCA
 GAAGATTAACAATGGCTCAAGCCAGGCGGATGGCACTCTCAAACCAGTGGATGAAAAAGAGGAG
 GCAGTGGCCGCCGAGGTCCGGCTGGATGACCTCCGTGAAGGACTGGGCGGGGGTGTATGATATCC
 GCCCAGACACTGACTGGCAGAGTCCTGGTTGTCTTAGTCTTTGCTCTCAGCATCGGTGCACTTGT
 AATATACTTCATAGATTCATCAAACCCAATAGAATCCTGCCAGAATTTCTACAAAGATTTACATTA
 CAGATCGACATGGCTTTCAACGTGTTCTTCCTTCTCTACTTTGGCTTGCGGTTTATTGCAGCCAAC
 GATAAATTGTGGTTCTGGCTGGAAGTGAACCTCTGTAGTGGATTTCTTCACGGTGCCCCCGTGT
 TGTGTCTGTGTACTTAAACAGAAGTTGGCTTGGTTTGAGATTTTTAAGAGCTCTGAGACTGATACA
 GTTTTCAGAAATTTTGCAGTTTCTGAATATTCTTAAACAAGTAATTCCATCAAGCTGGTGAATCTG
 CTCTCCATATTTATCAGCACGTGGCTGACTGCAGCCGGGTTCCATCCATTTGGTGGAGAATTCAGG
 GGACCCATGGGAAAATTTCCAAAACAACCAGGCTCTCACCTACTGGGAATGTGTCTATTTACTCAT
 GGTCAAAATGTCCACCGTTGGTTATGGGGATGTTTATGCAAAAACCACACTTGGGCGCCTCTTCA
 TGGTCTTCTTCATCCTCGGGGGACTGGCCATGTTTGCAGCTACGTCCCTGAAATCATAGAGTTA
 ATAGGAAACCGCAAGAAATACGGGGGCTCCTATAGTGCGGTTAGTGAAGAAAGCACATTGTGG
 TCTGCGGACACATCACTCTGGAGAGTGTTCCTCAACTTCTCTG**GACCTGATCTTCTGCCTG**

MaxiK_{A435} +ER-Export-Sequenz

Gelb dargestellt ist die „ER-Export-Sequenz“ die an den MaxiK_{A435} angehängt wurde.

ATGGATGCGCTCATCATCCCGGTGACCATGGAGGTGCCGTGCGACAGCCGGGGCCAACGCATG
 TGGTGGGCTTTCTGGCCTCCTCCATGGTGACTTTCTTCGGGGGCCTCTTCATCATCTTGCTCTG
 GCGGACGCTCAAGTACCTGTGGACCGTGTGCTGCCACTGCGGGGGCAAGACGAAGGAGGCCCA
 GAAGATTAACAATGGCTCAAGCCAGGCGGATGGCACTCTCAAACCAGTGGATGAAAAAGAGGAG
 GCAGTGGCCGCCGAGGTCCGGCTGGATGACCTCCGTGAAGGACTGGGCGGGGGTGTATGATATCC
 GCCCAGACACTGACTGGCAGAGTCCTGGTTGTCTTAGTCTTTGCTCTCAGCATCGGTGCACTTGT
 AATATACTTCATAGATTCATCAAACCCAATAGAATCCTGCCAGAATTTCTACAAAGATTTACATTA
 CAGATCGACATGGCTTTCAACGTGTTCTTCCTTCTCTACTTTGGCTTGCGGTTTATTGCAGCCAAC
 GATAAATTGTGGTTCTGGCTGGAAGTGAACCTCTGTAGTGGATTTCTTCACGGTGCCCCCGTGT
 TGTGTCTGTGTACTTAAACAGAAGTTGGCTTGGTTTGAGATTTTTAAGAGCTCTGAGACTGATACA
 GTTTTCAGAAATTTTGCAGTTTCTGAATATTCTTAAACAAGTAATTCCATCAAGCTGGTGAATCTG
 CTCTCCATATTTATCAGCACGTGGCTGACTGCAGCCGGGTTCCATCCATTTGGTGGAGAATTCAGG
 GGACCCATGGGAAAATTTCCAAAACAACCAGGCTCTCACCTACTGGGAATGTGTCTATTTACTCAT
 GGTCAAAATGTCCACCGTTGGTTATGGGGATGTTTATGCAAAAACCACACTTGGGCGCCTCTTCA
 TGGTCTTCTTCATCCTCGGGGGACTGGCCATGTTTGCAGCTACGTCCCTGAAATCATAGAGTTA
 ATAGGAAACCGCAAGAAATACGGGGGCTCCTATAGTGCGGTTAGTGAAGAAAGCACATTGTGG
 TCTGCGGACACATCACTCTGGAGAGTGTTCCTCAACTTCTGAAGGACTTTCTGCACAAGGACCGG
 GATGACGTCAATGTGGAGATCGTTTTTCTTCACAACATCTCCCCAACCTGGAGCTTGAAGCTCT
 GTTCAAACGACATTTTACTCAGGTGGAATTTTATCAGGGTTCCGTCCTCAATCCACATGATCTTGC
 AAGAGTCAAGATAGAGTCAGCAGATGCATGCCTGATCCTTGCCAACAAGTACTGCGCTGACCCG
 GATGCG**GACCTGATCTTCTGCCTG**

MaxiK_{E576} +ER-Export-Sequenz

Gelb dargestellt ist die „ER-Export-Sequenz“ die an den MaxiK_{E576} angehängt wurde.

ATGGATGCGCTCATCATCCCGGTGACCATGGAGGTGCCGTGCGACAGCCGGGGCCAACGCATG
 TGGTGGGCTTTCTGGCCTCCTCCATGGTGACTTTCTTCGGGGGCCTCTTCATCATCTTGCTCTG
 GCGGACGCTCAAGTACCTGTGGACCGTGTGCTGCCACTGCGGGGGCAAGACGAAGGAGGCCCA
 GAAGATTAACAATGGCTCAAGCCAGGCGGATGGCACTCTCAAACCAGTGGATGAAAAAGAGGAG
 GCAGTGGCCGCCGAGGTCCGGCTGGATGACCTCCGTGAAGGACTGGGCGGGGGTGTATGATATCC

GCCCAGACACTGACTGGCAGAGTCCTGGTTGTCTTAGTCTTTGCTCTCAGCATCGGTGCACTTGT
AATATACTTTCATAGATTCATCAAACCAATAGAATCCTGCCAGAATTTCTACAAAGATTTACATTA
CAGATCGACATGGCTTTCAACGTGTTCTTCTTCTACTTTGGCTTGCGGTTTATTGCAGCCAAC
GATAAATTGTGGTTCTGGCTGGAAGTGAACCTCTGTAGTGGATTTCTTACGGTGCCCCCGTGT
TGTGTCTGTGTACTTAAACAGAAGTTGGCTTGGTTTGGAGATTTTTAAGAGCTCTGAGACTGATACA
GTTTTTCAGAAATTTTGCAGTTTCTGAATATTCTTAAACAAGTAATTCCATCAAGCTGGTGAATCTG
CTCTCCATATTTATCAGCACGTGGCTGACTGCAGCCGGTTCATCCATTTGGTGGAGAATTCAGG
GGACCCATGGGAAAATTTCCAAAACAACCAGGCTCTCACCTACTGGGAATGTGTCTATTTACTCAT
GGTCACAATGTCCACCGTTGGTTATGGGGATGTTTATGCAAAAACCACACTTGGGCGCCTCTTCA
TGGTCTTCTTATCCTCGGGGGACTGGCCATGTTTGCAGCTACGTCCCTGAAATCATAGAGTTA
ATAGGAAACCGCAAGAAATACGGGGGCTCCTATAGTGCGGTTAGTGGAAGAAAGCACATTGTGG
TCTGCGGACACATCACTCTGGAGAGTGTTCACAACCTTCTGAAGGACTTTCTGCACAAGGACCGG
GATGACGTC AATGTGGAGATCGTTTTTCTTACAACATCTCCCCAACCTGGAGCTTGAAGCTCT
GTTCAAACGACATTTTACTCAGGTGGAATTTTATCAGGGTTCCGTCCTCAATCCACATGATCTTGC
AAGAGTCAAGATAGAGTCAGCAGATGCATGCCTGATCCTTGCCAACAAGTACTGCGCTGACCCG
GATGCGGAGGATGCCTCGAATATCATGAGAGTAATCTCCATAAAGAAGTACTCCGAAAGATAAG
AATCATCACTCAAATGCTGCAGTATCACAACAAGGCCATCTGCTAAACATCCCGAGCTGGAATT
GGAAAGAAGGTGATGACGCAATCTGCCTCGCAGAGTTGAAGTTGGGCTTCATAGCCCAGAGCTG
CCTGGCTCAAGGCCTCTCCACCATGCTTGCCAACCTCTTCTCCATGAGGTCATTATAAAGATTG
AGGAAGACACATGGCAGAAATACTACTTGAAGGAGTCTCAAATGAAATGTACACAGAATATCTC
TCCAGTGCCTTCGTGGGTCTGCCTTCCCTACTGTTTGTGAGCTGTGTTTTGTGAAGCTCAAGCT
CCTAATGATAGCCATTGAGTACAAGTCTGCCAACCGAGAG **GACCTGATCTTCTGCCTG**

MaxiK_{E576}

ATGGATGCGCTCATCATCCCGGTGACCATGGAGGTGCCGTGCGACAGCCGGGGCCAACGCATG
TGGTGGGCTTTCTGGCCTCCTCCATGGTGACTTTCTTGGGGGCCTCTTCATCATCTTGCTCTG
GCGGACGCTCAAGTACCTGTGGACCGTGTGCTGCCACTGCGGGGGCAAGACGAAGGAGGCCCA
GAAGATTAACAATGGCTCAAGCCAGGCGGATGGCACTCTCAAACCAGTGGATGAAAAAGAGGAG
GCAGTGGCCGCGAGGTGGCTGGATGACCTCCGTGAAGGACTGGGCGGGGGTGTATGATATCC
GCCAGACACTGACTGGCAGAGTCCTGGTTGTCTTAGTCTTTGCTCTCAGCATCGGTGCACTTGT
AATATACTTTCATAGATTCATCAAACCAATAGAATCCTGCCAGAATTTCTACAAAGATTTACATTA
CAGATCGACATGGCTTTCAACGTGTTCTTCTTCTACTTTGGCTTGCGGTTTATTGCAGCCAAC
GATAAATTGTGGTTCTGGCTGGAAGTGAACCTCTGTAGTGGATTTCTTACGGTGCCCCCGTGT
TGTGTCTGTGTACTTAAACAGAAGTTGGCTTGGTTTGGAGATTTTTAAGAGCTCTGAGACTGATACA
GTTTTTCAGAAATTTTGCAGTTTCTGAATATTCTTAAACAAGTAATTCCATCAAGCTGGTGAATCTG
CTCTCCATATTTATCAGCACGTGGCTGACTGCAGCCGGTTCATCCATTTGGTGGAGAATTCAGG
GGACCCATGGGAAAATTTCCAAAACAACCAGGCTCTCACCTACTGGGAATGTGTCTATTTACTCAT
GGTCACAATGTCCACCGTTGGTTATGGGGATGTTTATGCAAAAACCACACTTGGGCGCCTCTTCA
TGGTCTTCTTATCCTCGGGGGACTGGCCATGTTTGCAGCTACGTCCCTGAAATCATAGAGTTA
ATAGGAAACCGCAAGAAATACGGGGGCTCCTATAGTGCGGTTAGTGGAAGAAAGCACATTGTGG
TCTGCGGACACATCACTCTGGAGAGTGTTCACAACCTTCTGAAGGACTTTCTGCACAAGGACCGG
GATGACGTC AATGTGGAGATCGTTTTTCTTACAACATCTCCCCAACCTGGAGCTTGAAGCTCT
GTTCAAACGACATTTTACTCAGGTGGAATTTTATCAGGGTTCCGTCCTCAATCCACATGATCTTGC
AAGAGTCAAGATAGAGTCAGCAGATGCATGCCTGATCCTTGCCAACAAGTACTGCGCTGACCCG
GATGCGGAGGATGCCTCGAATATCATGAGAGTAATCTCCATAAAGAAGTACTCCGAAAGATAAG
AATCATCACTCAAATGCTGCAGTATCACAACAAGGCCATCTGCTAAACATCCCGAGCTGGAATT
GGAAAGAAGGTGATGACGCAATCTGCCTCGCAGAGTTGAAGTTGGGCTTCATAGCCCAGAGCTG
CCTGGCTCAAGGCCTCTCCACCATGCTTGCCAACCTCTTCTCCATGAGGTCATTATAAAGATTG
AGGAAGACACATGGCAGAAATACTACTTGAAGGAGTCTCAAATGAAATGTACACAGAATATCTC
TCCAGTGCCTTCGTGGGTCTGCCTTCCCTACTGTTTGTGAGCTGTGTTTTGTGAAGCTCAAGCT
CCTAATGATAGCCATTGAGTACAAGTCTGCCAACCGAGAG

MaxiK_{S577-L1113}

AGCCGTATATTAATTAATCCTGGAAACCATCTTAAGATCCAAGAAGGTACTTTAGGATTTTTTCATCG
CAAGTGATGCCAAAGAAGTTAAAAGGGCATTTTTTTTACTGCAAGGCCTGTCATGATGACATCACA
GATCCCAAAAAGATAAAAAAATGTGGCTGCAACCGCTTGAAGATGAGCAGCCGTCAACACTATC
ACCAAAAAAAGCAACGGAATGGAGGCATGCGGAACTCACCAACACCTCGCCTAAGCTGATG

AGGCATGACCCCTTGTTAATTCCTGGCAATGATCAGATTGACAACATGGACTCCAATGTGAAGAA
GTACGACTCTACTGGGATGTTTCACTGGTGTGCACCCAAGGAGATAGAGAAAGTCATCCTGACTC
GAAGTGAAGCTGCCATGACCGTCTGAGTGGCCATGTCGTGGTCTGCATCTTTGGCGACGTCAG
CTCAGCCCTGATCGGCCTCCGGAACCTGGTGATGCCGCTCCGTGCCAGCAACTTTCATTACCAT
GAGCTCAAGCACATTGTGTTTGTGGGCTCTATTGAGTACCTCAAGCGGGAATGGGAGACGCTTCA
TAACTTCCCCAAAGTGTCCATATTGCCTGGTACGCCATTAAGTCGGGCTGATTTAAGGGCTGTCA
ACATCAACCTCTGTGACATGTGCGTTATCCTGTCAGCCAATCAGAATAATATTGATGATACTTCGC
TGCAGGACAAGGAATGCATCTTGGCGTCACTCAACATCAAATCTATGCAGTTTGATGACAGCATC
GGAGTCTTGCAGGCTAATTCCAAGGGTTCACACCTCCAGGAATGGATAGATCCTCTCCAGATAA
CAGCCCAGTGCACGGGATGTTACGTCAACCATCCATCACAACCTGGGGTCAACATCCCCATCATCA
CTGAACTAGTGAACGATACTAATGTTTCAGTTTTTGGACCAAGACGATGATGATGACCCTGATACAG
AACTGTACCTCACGCAGCCCTTTGCCTGTGGGACAGCATTGCGCTCAGTGCCTGGACTCACTC
ATGAGCGCGACGTACTTCAATGACAATATCCTCACCTGATACGGACCCTGGTGACCGGAGGAG
CCACGCCGGAGCTGGAGGCTCTGATTGCTGAGGAAAACGCCCTTAGAGGTGGCTACAGCACCC
CGCAGACACTGGCCAATAGGGACCGCTGCCGCGTGGCCAGTTAGCTCTGCTCGATGGGCCAT
TTGCGGACTTAGGGGATGGTGGTTGTTATGGTGATCTGTTCTGCAAAGCTCTGAAAACATATAATA
TGCTTTGTTTTGGAATTTACCGGCTGAGAGATGCTCACCTCAGCACCCCCAGTCAGTGCACAAAG
AGGTATGTCATACCAACCCGCCCTATGAGTTTGGAGCTCGTGCCGACGGACCTGATCTTCTGCTT
AATGCAGTTTGACCACAATGCCGGCCAGTCCCGGGCCAGCCTGTCCCATTCTCCCACTCGTCCG
CAGTCTCCAGCAAGAAGAGCTCCTCTGTTCACTCCATCCCATCCACAGCAAACCGACAGAACCG
GCCAAGTCCAGGGAGTCCCGGGACAAACAGAAGTACGTGCAGGAAGAGCGGCTT

Abkürzungen

5-HT _{1A} -Rezeptor	Serotonin-Rezeptor
ACh	Acetylcholin
ACSF	Artificial Cerebro-Spinal Fluid
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BK	big conductance K ⁺ channel
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
ChTX	Charybdotoxin
DAG	Diacylglycerol
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylene-diamine-tetraacetic acid, Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
E _{Na}	Gleichgewichtspotential für Na ⁺ -Ionen
E _K	Gleichgewichtspotential für K ⁺ -Ionen
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetal Calf Serum
G418	Geneticin
G _{βγ}	G-Protein _{βγ}
G _q	G-Protein _q
GABA _B	Gamma-aminobutyric acid; γ-Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
GEPD	Generalisierte Epilepsie und Paroxysmale Dyskinesie
GFP	Green Fluorescent Protein
GIRK	G protein-coupled inwardly rectifying K ⁺ channel; G-Protein-gekoppelter einwärts-gleichrichtender K ⁺ -Kanal
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
GTP _γ S	Guanosin 5'-(3-O-thio)triphosphat
HEK	Human Embryonic Kidney Cells
HEK293	Nieren-Zelllinie des Menschen
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HERG	Human Ether-a-go-go Related Gene channels
IbTX	Iberiotoxin
IC ₅₀	halb-maximale inhibitorische Konzentration
IK	intermediate conductance potassium channel
IP ₃	Inositol(1,4,5)-trisphosphat
IRK	inwardly rectifying potassium channel; einwärts-gleichrichtender K ⁺ -Kanal
K _{2P}	two-pore-domain K ⁺ -channels
K _{ACh} -Kanal	atrial acetylcholine-activated K ⁺ channel
K _{ATP}	ATP-sensitive potassium channels
Kir	inwardly rectifying potassium channel; einwärts-gleichrichtende K ⁺ -Kanäle
Kir1.1	= ROMK1

Abkürzungen

Kir2.1	= IRK1
Kir2.1(L222I)	Mutante des IRK1
Kir3.1	= GIRK1
Kir3.1/3.2(I232L)	Heteromer aus GIRK1 und einer Mutante des GIRK2
Kir3.1/3.2 _{Kir2.1-PIP}	Mutante des GIRK1 und des GIRK2, bei der die PIP ₂ -Bindungs-Sequenz gegen die des IRK1 ausgetauscht wurde
Kir3.1 _{G431}	Mutante des GIRK1
Kir3.1 _{C179_V179} Kir2.1	Chimäre aus GIRK1 und IRK1
Kir3.2	= GIRK2
Kir3.2 _{C188_V179} Kir2.1	Chimäre aus GIRK2 und IRK1
Kir3.4	= GIRK4
Kir6	= K _{ATP}
K _v	spannungsabhängige K ⁺ -Kanäle
LB	Luria Broth Base
M1-, M3- Rezeptor	muscarinerge Acetylcholin-Rezeptoren
m-3M3FBS	2,4,6-Trimethyl-N-(m-3-trifluoromethylphenyl)benzenesulfonamide
MaxiK _{E576}	Mutante des MaxiK
MaxiK _{I322}	Mutante des MaxiK
MaxiK _{L360}	Mutante des MaxiK
MaxiK _{S577-L1113}	Mutante des MaxiK
MEM	Modified Eagle Medium
MTSES	2-sulfonatoethyl methanethiosulfonate sodium salt
NCDC	2-nitro-4-carboxyphenyl N,N-diphenylcarbamate
NEM	N-ethylmaleimide
NP _o	Offenwahrscheinlichkeit
NO	Nitric Oxide; Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIP	Phosphatidylinositol-phosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat (PtdIns(4,5)P ₂)
PLC	Phospholipase C
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PNS	Peripheres Nervensystem
RCK	Regulator of conductance for potassium
ROMK	renal outer medullary potassium channel
SK	small conductance potassium channel
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis (signal to noise ratio)
TBE	Tris-Borate-EDTA-Puffer
TEA	Tetraethylammoniumchlorid
TM	Transmembrandomänen
TTX	Tetrodotoxin
V _{mid}	halbmaximale Aktivierungsspannung
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Alzheimer bedanken – für die Aufgabenstellung, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, für die wertvollen Anregungen, für die kontinuierliche Unterstützung und vor allem für die Geduld!

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Tobias Huth, ohne den diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre. Vielen Dank für die Hilfe und die harmonische Zusammenarbeit!

Weiterhin danke ich:

- Prof. Dr. U.-P. Hansen für die Unterstützung beim MaxiK
- Prof. Dr. M. Bleich, Prof. Dr. W. Ulbricht und Dr. Fang Zheng für die Begleitung meiner Arbeit
- Didier Gremelle für die Hilfe rund um die Zellkultur, beim Erstellen der Messlösungen, bei der Präparation der Ratten und bei den Abbildungen
- Dr. H. Wiese für die Unterstützung im alltäglichen Kampf mit dem Computer
- und Kerstin Kronbitter für die Hilfe bei der Zellkultur

Meinen Mitdoktoranden Philipp, Matthias, Karoline, Katja und Meike danke ich für den Spaß, den wir während der Arbeit hatten.

Und natürlich danke ich meinen Eltern für die Unterstützung und unendliche Geduld!

Lebenslauf

Angelika Klose

Geboren am 26.06.1980 in Stuttgart

08 / 1987 – 06 / 1991

Besuch der Grundschule Borgstedt

08 / 1991 – 06 / 2000

Besuch des Gymnasium Kronwerk

06 / 2000

Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

10 / 2000

Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

08 / 2002

Physikum

09 / 2003

1. Staatsexamen

09 / 2005

2. Staatsexamen

Praktisches Jahr:

Chirurgische Abteilung, Kreiskrankenhaus Eckernförde
Innere Medizin, Friedrich-Ebert-Krankenhaus Neumünster
Klinik für Orthopädie, UK-SH, Campus Kiel

04 / 2006

Beginn der Arbeit an der vorliegenden Dissertation im
Physiologischen Institut der CAU Kiel

12 / 2006

3. Staatsexamen

06 / 2007

Approbation als Ärztin

09 / 2008 – 09 / 2011

Masterstudium Sportpsychologie an der Hochschule für
Gesundheit und Sport in Berlin