

Aus dem Physiologischen Institut
(Direktoren: Prof. Dr. Markus Bleich,
Prof. Dr. Thomas Baukrowitz, Prof. Dr. Peer Wulff)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Charakterisierung der Wirkung und des
Wirkmechanismus von pharmakologischen
Aktivatoren und Inhibitoren
des BK_{Ca}-Kanals

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

vorgelegt von
Freya Johanna Werkmeister
aus Oldenburg (Oldb)

Kiel 2025

- 1. Berichtstatter:** Prof. Dr. Thomas Baukrowitz, Physiologisches Institut
 - 2. Berichtstatter:** Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly, Biochemisches Institut
- Tag der mündlichen Prüfung:** 22.04.2026
- Zum Druck genehmigt:** Kiel, den 13.03.2026

gez.: Prof. Dr. Peer Wulff, Physiologisches Institut
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Kaliumkanäle	1
1.2 Kalziumaktivierter Kaliumkanal (BK _{Ca} -Kanal)	2
1.2.1 Struktur und Biophysik	2
1.2.2 Gating-Mechanismen	5
1.2.3 Physiologie und Pathophysiologie	5
1.2.4 Pharmakologie	10
1.2.4.1 BK _{Ca} -Kanal Aktivatoren	10
1.2.4.2 BK _{Ca} -Kanal Inhibitoren	13
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Mutagenese und RNA-Synthese	18
2.2 Oozytenpräparation und RNA-Injektion	19
2.3 Elektrophysiologische Ableitungen (Patch-Clamp-Messungen)	20
2.4 Datenerhebung, Statistik und Ergebnisdarstellung	23
2.5 Verwendete Lösungen und Chemikalien	25
3. Ergebnisse	27
3.1 Effekt von Rubidium (Rb ⁺) als permeierende Ionenspezies	27
3.2 Aktivatoren	28
3.2.1 Etablierte BK _{Ca} -Kanal Aktivatoren	28
3.2.1.1 NS11021	28
3.2.1.2 Active Blue 25	30
3.2.1.3 GoSlo-SR-5-6	31
3.2.2 Nicht-etablierte BK _{Ca} -Kanal Aktivatoren	32
3.2.2.1 hERG-Kanal Aktivator NS3623	32
3.2.2.2 K _{2P} -Kanal Aktivator ML67-33	32
3.3 Inhibitoren des BK _{Ca} -Kanals	33
3.3.1 Quartäre Ammoniumverbindungen (QA ⁺)	33

3.3.1.1 Tetrapentylammonium	33
3.3.1.2 Tetrahexylammonium	33
3.3.1.3 Tetraheptylammonium	34
3.4 QA ⁺ -Kompetitionsversuche mit Aktivatoren	34
3.4.1 QA ⁺ -Kompetitionsversuch mit NS11021	35
3.4.2 QA ⁺ -Kompetitionsversuch mit NS3623	36
3.4.3 QA ⁺ -Kompetitionsversuch mit PD-118057	36
3.4.4 QA ⁺ -Kompetitionsversuch mit ML67-33	37
3.4.5 QA ⁺ -Kompetitionsversuch mit Active Blue 25	38
3.5 Systematische Untersuchung der porenformenden TM-Domäne S6.....	40
3.5.1 Effekt von Mutante A316E.....	40
3.5.2 Effekt von Mutante S317R	43
3.5.3 Effekt von Mutante Y318S	44
4. Besprechung der Ergebnisse (Diskussion)	46
4.1 Polypharmakologie der Kaliumkanäle – Fokus auf den BK _{Ca} -Kanal	47
4.2 Negativ geladene Aktivatoren binden in räumlicher Nähe von quartären Ammoniumverbindungen	49
4.3 Systematische Untersuchung der porenformenden TM-Domäne S6	51
4.3.1 Neuorientierung der Seitenkette der Aminosäure A316 resultiert in BK _{Ca} -Kanal Öffnung	51
4.3.2 Die Mutante S317R reduziert den Effekt von Active Blue 25 und GoSlo-SR-5-6 und nicht von NS11021	52
4.3.3 Unveränderter Effekt von Active Blue 25 auf die Mutante Y318S	53
4.3.4 Hydrophobes Gating	53
4.4 Schlusswort und Ausblick	54
5. Zusammenfassung	57
6. Literaturverzeichnis	58
7. Danksagung	64

8. Eidesstattliche Erklärung 65

Abkürzungsverzeichnis

BK _{Ca} -Kanal	kalziumaktivierter Kaliumkanal mit hoher Einzelleitfähigkeit
CTD	zytosolische Domäne (cytosolic tail domain)
DHA	Docosahexaensäure (docosahexaenoic acid)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	mittlere effektive Wirkstoffkonzentration
EGTA	Ethylenglykol-bis-(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
GOF	Gain-of-Function
GoSlo-SR-5-6	Sodium 1-amino-4-((3-trifluoromethylphenyl)amino)-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracene-2-sulfonate
HK	Hill-Koeffizient
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
hERG-Kanal	spannungsaktivierter, einwärts gleichrichtender Kaliumkanal in Herzmuskelzellen (human ether-a-gogo-related gene channel)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Wirkstoffkonzentration
K ⁺	Kaliumionen
K _{2P} -Kanal	Zwei-Porendomänen-Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
K _{ir} -Kanal	einwärts rektifizierender Kaliumkanal (inwardly rectifying K ⁺ channel)
K _v -Kanal	spannungsabhängiger Kaliumkanal (voltage-gated K ⁺ channel)
LOF	Loss-of-Function
MW	Mittelwert
ML67-33	2,7-Dichloro-9,9-dimethyl-10-[2-(1H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)ethyl]-4a,9a-dihydroacridine
n	Anzahl
nA	Nanoampere
NCA _s	negativ geladene Aktivatoren (negatively charged activators)
NS11021	N'-[3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl]-N-[4-bromo-2-(2H-tetrazol-5-yl)phenyl]-thiourea
NS3623	N-[4-Bromo-2-(1H-tetrazol-5-yl-phenyl)]-N'-[3(trifluoromethyl)phenyl]-urea
PD	Poren-Domäne (pore domain)
PD-118057	2-[[4-[2-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]phenyl]amino]benzoic acid
QA ⁺	quartäre Ammoniumionen

Rb ⁺	Rubidiumionen
RCK-Domänen	regulatorische Domänen von Kaliumkanälen (regulator of conductance for K ⁺)
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
TButA	Tetrabutylammonium
THepA	Tetraheptylammonium
THexA	Tetrahexylammonium
TM-Domäne	Transmembran-Domäne
TPenA	Tetrapentylammonium
VSD	spannungsvermittelnde Domäne (voltage sensing domain)
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

- 1..... Struktur des BK_{Ca}-Kanals
- 2..... Darstellung des Mechanismus der negativen Rückkopplung durch den BK_{Ca}-Kanal
- 3..... BK_{Ca}-Kanal Expression im menschlichen Gewebe und Phänotypen der KCNMA1-spezifischen Kanalopathie
- 4..... Menschliche KCNMA1-Mutationen
- 5..... Mg²⁺-abhängige Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals
- 6..... Repräsentative Bindungskonformationen von Tetrabutylammonium und Tetraethylammonium in der tiefen Porenregion des BK_{Ca}-Kanals
- 7..... *Xenopus laevis* Oozyten in verschiedenen Entwicklungsstadien
- 8..... Teilausschnitt des Patch-Clamp-Messstandes
- 9..... Schematische Darstellung des elektrischen Schaltkreises im Patch-Clamp-Experiment
- 10..... Intrazelluläres Rubidium aktiviert den BK_{Ca}-Kanal
- 11..... Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch NS11021
- 12..... Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch NS11021 in Rubidium
- 13..... Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch Active Blue 25
- 14..... Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch GoSlo-SR-5-6
- 15..... Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch NS3623
- 16..... Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch ML67-33
- 17..... Inhibition des BK_{Ca}-Kanals durch Tetrapentylammonium
- 18..... Inhibition des BK_{Ca}-Kanals durch Tetrahexylammonium
- 19..... Inhibition des BK_{Ca}-Kanals durch Tetraheptylammonium
- 20..... QA⁺-Kompetitionsversuch mit NS11021
- 21..... QA⁺-Kompetitionsversuch mit NS3623
- 22..... QA⁺-Kompetitionsversuch mit PD-118057
- 23..... QA⁺-Kompetitionsversuch mit ML67-33
- 24..... QA⁺-Kompetitionsversuch mit Active Blue 25
- 25..... Vergleich der IC₅₀-Werte der QA⁺-Kompetitionsversuche
- 26..... Topologiemodell und Sequenzabschnitt des BK_{Ca}-Kanals
- 27..... Vergleich der Stromantworten im Grundzustand des BK_{Ca}-Kanal Wildtyps und der Mutante A316E
- 28..... Intrazelluläres Rubidium inhibiert den Auswärtsstrom in der Mutante

A316E des BK_{Ca}-Kanals

- 29..... Verminderter Effekt von Active Blue 25 auf die Mutante A316E des BK_{Ca}-Kanals
- 30..... Vergleich der jeweiligen Aktivierungen der Mutante S317R des BK_{Ca}-Kanals durch Active Blue 25, GoSlo-SR-5-6 und NS11021
- 31..... Aktivierung der Mutante Y318S des BK_{Ca}-Kanals durch Active Blue 25
- 32..... Übersicht über die negativ geladenen BK_{Ca}-(NS11021, GoSlo-SR-5-6), hERG-(PD-118057, NS3623) und K_{2P}-(ML67-33) Kanal Aktivatoren
- 33..... Darstellung der gemeinsamen Bindungsstelle von Tetrahexylammonium und NS11021 unmittelbar unterhalb des Selektivitätsfilters in der inneren Pore des BK_{Ca}-Kanals
- 34..... Darstellung der Struktur des BK_{Ca}-Kanals (Proteindatenbank 5TJI) und der bevorzugten Bindungsstelle von NS11021

1. Einleitung

1.1 Kaliumkanäle

Die Zellmembran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht und dient der Abschirmung des Zellinneren vom Extrazellulärraum. Die Zellmembran ist für Gase und lipophile Substanzen durchlässig, für hydrophile Moleküle und Ionen stellt sie hingegen eine Barriere dar. Transmembranproteine, die in die Zellmembran eingelagert sind, ermöglichen einen Austausch von Ionen und hydrophilen Molekülen zwischen dem Intrazellulär- und dem Extrazellulärraum. Man unterscheidet zwischen Ionenkanälen, Carriern und Pumpen. Ionenkanäle sind komplex regulierte, porenbildende Transmembranproteine, die einen schnellen Fluss von 10^6 - 10^8 Ionen pro Sekunde über die Zellmembran ermöglichen. Der Ionenfluss erfolgt dabei entlang des elektrochemischen Gradienten. Ionenkanäle ermöglichen grundlegende physiologische Prozesse wie die Erregungsbildung und Erregungsfortleitung in Nervenzellen, die Muskelkontraktion oder die Hormonausschüttung und zeigen neben der hohen Permeabilität eine hohe Selektivität für permeierende Ionen (Ashcroft, 2000; Hille, 2001).

Die größte Gruppe der Ionenkanäle repräsentieren die kaliumselektiven Ionenkanäle, für die über 80 Gene im menschlichen Genom kodieren (Villa & Combi, 2016). Die Kaliumkanäle (K^+ -Kanäle) werden in vier Familien unterteilt: einwärts rektifizierende Kaliumkanäle (inwardly rectifying, K_{ir}), Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle (K_{2P}), spannungsabhängige Kaliumkanäle (voltage-activated, K_v) und kalziumaktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca}).

Ein funktionsfähiger Kaliumkanal besteht meistens aus vier α -Untereinheiten, die tetrasymmetrisch angeordnet sind (MacKinnon, 1991). Eine α -Untereinheit besteht aus mindestens zwei membrandurchspannenden Domänen, sog. Transmembran (TM)-Domänen, und einer dazwischen liegenden Poren (P)-Domäne.

Einwärts rektifizierende Kaliumkanäle setzen sich aus vier α -Untereinheiten zusammen, welche jeweils zwei TM-Domänen und eine P-Domäne (2TM/1P) enthalten. Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle setzen sich aus zwei α -Untereinheiten mit jeweils vier TM-Domänen und zwei P-Domänen (4TM/2P) zusammen. Einen funktionellen Kanal können K_{2P} -Kanäle bilden, indem sie sich als Dimer und nicht als Tetramer formieren. Bis heute wurden 15 K_{2P} -Kanäle beschrieben. Sie lassen sich in die sechs Subfamilien einteilen: TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK und TRESK (Enyedi & Czirjak, 2010).

Zur Gruppe der Kaliumkanäle mit sechs TM-Domänen und einer P-Domäne (6TM/1P) gehören die kalziumaktivierten Kaliumkanäle und die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (Coetzee et al., 1999). Ein wichtiger Vertreter der K_v -Kanäle ist der hERG (human ether-a-gogo-related gene)-Kanal, der in Herzmuskelzellen für die schnelle Repolarisation verantwortlich ist. Die kalziumaktivierten Kaliumkanäle lassen sich auf Grundlage ihrer Leitfähigkeit in drei Subfamilien einteilen: kalziumaktivierte Kaliumkanäle mit einer hohen Leitfähigkeit von 100 bis 300 pS (big-conductance, BK_{Ca} , Slo1, Maxi-K, $K_{Ca1.1}$), kalziumaktivierte Kaliumkanäle mit einer mittleren Leitfähigkeit von 25 bis 100 pS (intermediate-conductance, IK_{Ca}) und kalziumaktivierte Kaliumkanäle mit einer geringen Leitfähigkeit von 2 bis 25 pS (small-conductance, SK_{Ca}). IK_{Ca} - und SK_{Ca} -Kanäle werden durch geringe intrazelluläre Kalzium (Ca^{2+})-Konzentrationen aktiviert und sind unempfindlich gegenüber Spannungsänderungen. Der BK_{Ca} -Kanal wird hingegen durch eine Änderung des Membranpotentials (Depolarisation) und durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert (Gueguinou et al., 2014).

1.2 Kalziumaktivierter Kaliumkanal (BK_{Ca} -Kanal)

1.2.1 Struktur und Biophysik

Der BK_{Ca} -Kanal besteht aus einem Komplex mit vier porenformenden α -Untereinheiten und zusätzlich assoziierten β -Untereinheiten. Die α -Untereinheiten werden durch das Gen *KCNMA1* im menschlichen Genom kodiert. Das *KCNMA1*-Gen ist in dem menschlichen Chromosom 10q22.3 zu finden (Bailey, Moldenhauer, Park, Keros, & Meredith, 2019). Seine funktionelle Vielfalt erhält der BK_{Ca} -Kanal durch unterschiedliche Spleißvarianten der *KCNMA1*-RNA, durch Proteinphosphorylierung sowie durch die gewebsspezifische Modulation seiner regulatorischen β -Untereinheiten (Orio & Latorre, 2005). Es konnten vier verschiedene β -Untereinheiten identifiziert werden (Orio, Rojas, Ferreira, & Latorre, 2002). Sie werden durch die Gene *KCNMB1-4* kodiert (Bailey et al., 2019). Die $\beta1$ -Untereinheit wird in glatten Muskelzellen exprimiert. Eine Koexpression der α - und $\beta1$ -Untereinheit erhöht die Kalzium- und Spannungssensitivität des BK_{Ca} -Kanals (Dworetzky et al., 1996). Die $\beta2$ -Untereinheit wird im Gehirn und in chromaffinen Zellen exprimiert (Wallner, Meera, & Toro, 1996; Xia, Ding, & Lingle, 1999). Die $\beta3$ -Untereinheit findet sich im Pankreas, im Hoden, in der Hypophyse, in der Niere sowie im Gehirn (Xia, Ding, Zeng, Duan, & Lingle, 2000). Die $\beta4$ -Untereinheit wird im Gehirn exprimiert (Lee & Cui, 2010). Eine Koexpression der α - und $\beta4$ -Untereinheit senkt die Kalziumsensitivität des BK_{Ca} -Kanals (Brenner et al., 2000; Meera,

Wallner, & Toro, 2000). In dieser Arbeit wurde die α -Untereinheit des mBK_{Ca} -Kanals untersucht. Auf zusätzlich assoziierte β -Untereinheiten wurde verzichtet.

Die α -Untereinheit des BK_{Ca} -Kanals umfasst, abweichend von der Zugehörigkeit zur Gruppe der Kaliumkanäle mit sechs TM-Domänen und einer P-Domäne (6TM/1P), sieben TM-Domänen (S0-S6). Die zusätzliche TM-Domäne S0 und der extrazelluläre N-Terminus unterscheiden den BK_{Ca} -Kanal von anderen Kaliumkanälen mit sechs TM-Domänen und ermöglichen eine Interaktion mit den zusätzlich assoziierten β -Untereinheiten (Bailey et al., 2019). Die TM-Domäne S0 interagiert außerdem direkt mit der spannungsvermittelnden Domäne (voltage sensing domain, VSD) und beeinflusst hierüber die Konformation des BK_{Ca} -Kanals (Liu et al., 2008). Die TM-Domänen S1-S4 bilden die spannungsvermittelnde Domäne, welche Veränderungen des Membranpotentials registriert und vermittelt (Rockman, Vouga, & Rothberg, 2020; Zang, Zhang, Hu, & Wang, 2018). Die TM-Domäne S4 enthält eine Aminosäuresequenz mit drei positiv geladenen Arginin-Resten (R196, R199, R202) und dient als hauptsächlicher Spannungssensor in der VSD (X. Tao, Hite, & MacKinnon, 2017). Die TM-Domänen S5 und S6 bilden gemeinsam die Poren-Domäne. Die S6 Helices der vier α -Untereinheiten formen die Pore und somit den Weg für die permeierenden Kaliumionen.

Die BK_{Ca} -Kanalpore bleibt Richtung intrazellulär physikalisch offen mit einem Radius von ~ 6 Å (Jia, Yazdani, Zhang, Cui, & Chen, 2018; W. Li & Aldrich, 2004; Wilkens & Aldrich, 2006). Ein hydratisiertes Kaliumion gelangt somit ungehindert vom Intrazellulärraum über den Poreneingang in die BK_{Ca} -Kanalkavität. Anschließend muss das Kaliumion den Selektivitätsfilter (SF) am extrazellulären Ende der Pore passieren. Der Selektivitätsfilter bildet die engste Stelle der Kanalpore und enthält vier Kaliumbindungsstellen (S1- S4). Daneben gibt es noch zwei weitere Ionenbindungsstellen: S5 am intrazellulären Poreneingang und S0 am extrazellulären Porenausgang. Der Selektivitätsfilter ist gekennzeichnet durch eine charakteristische Aminosäuresequenz (Salkoff, Butler, Ferreira, Santi, & Wei, 2006). Die Carbonylsauerstoffatome innerhalb dieser Aminosäuresequenz können die Hydrathülle eines permeierenden Kaliumions (Radius 1,33 Å) passgenau ersetzen und eine Dehydratation des Kaliumions ermöglichen. Anschließend wird das Kaliumion in den Extrazellulärraum entlassen. Dieser Hydrathüllenersatz ist Grundlage der hohen Selektivität der Kaliumkanäle. Natriumionen (Radius 0,95 Å) können den Kanal nicht passieren (Fakler & Jonas, 2011). Die

Permeation von Rubidiumionen (Rb^+ , Radius 1,48 Å) ist dem BK_{Ca} -Kanal allerdings möglich (Demo & Yellen, 1992; Doyle et al., 1998; Swenson & Armstrong, 1981).

Die Poren-Domäne und die spannungsvermittelnde Domäne interagieren über den S4-S5 Linker sowie über die benachbarten, gegenläufig verlaufenden, dicht gepackten TM-Domänen S4 und S5 miteinander (Hite, Tao, & MacKinnon, 2017). Die TM-Domäne S6 ist über einen C-Linker mit der zytosolischen Domäne (cytosolic tail domain, CTD) verbunden. Die Hauptkomponenten der zytosolischen Domäne sind die regulatorischen Domänen RCK1 und RCK2 (regulator of conductance for K^+) (Zhu, Ye, Chen, & Zhang, 2018). Vier zytosolische Domänen eines tetrameren BK_{Ca} -Kanals bilden gemeinsam eine Gating Ring Struktur, welche als Kalziumsensor dient und entscheidend für die allosterische Aktivierung des BK_{Ca} -Kanals durch Kalzium ist (Zhu et al., 2018). RCK1 besteht aus 266, RCK2 aus 376 Aminosäuren (Yuan, Leonetti, Pico, Hsiung, & MacKinnon, 2010). Jede RCK-Domäne kann unterteilt werden in drei Subdomänen: die Rossmann-Faltung formt den zentralen Kern des Gating Rings, das Helix-Crossover verbindet RCK1 und RCK2 in derselben α -Untereinheit und der C-Terminus, welcher sich in der Peripherie befindet und die Integrität der Gating Struktur aufrechterhält (Yang, Zhang, & Cui, 2015).

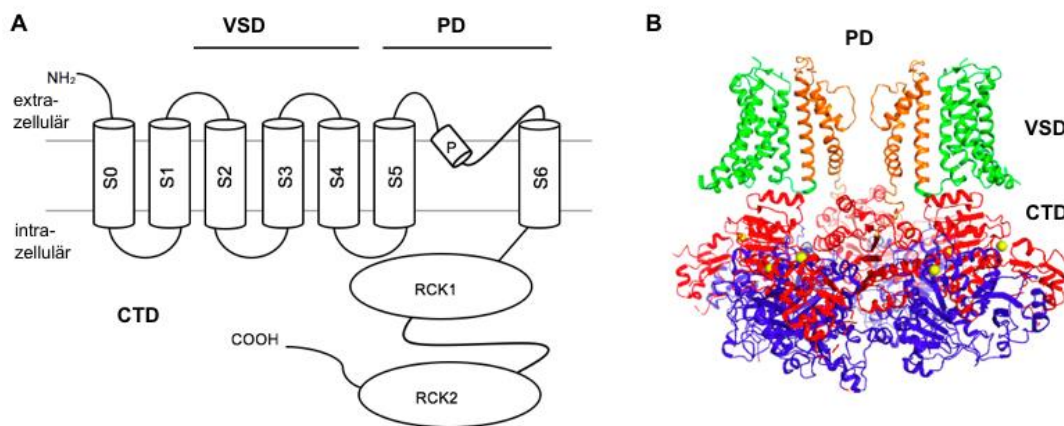


Abbildung 1: Struktur des BK_{Ca} -Kanals. (A) Membrantopologie einer α -Untereinheit des BK_{Ca} -Kanals, dargestellt sind die sieben TM-Domänen S0-S6. S1-S4 bilden die spannungsvermittelnde Domäne. S5, P und S6 bilden die Poren-Domäne; RCK1 und RCK2 bilden die zytosolische Domäne (B) Struktur des humanen BK_{Ca} -Kanals (Proteindatenbank 6V38). Die spannungsvermittelnde Domäne (grün) und die Poren-Domäne (orange) sind aus Übersichtsgründen nur von zwei α -Untereinheiten dargestellt. Ca^{2+} -Ionen (gelb) binden an der zytosolischen Domäne (rot und blau) (Cui, 2020; Xiao Tao & MacKinnon, 2019).

1.2.2 Gating-Mechanismen

Ionenkanäle können durch ihr Kanalschaltverhalten (Gating) unterschiedliche Konformationszustände annehmen. Man unterscheidet im einfachsten Ausdruck einen für die betreffenden Ionen durchlässigen (offenen, aktivierten) Ionenkanal von einem für Ionen undurchlässigen (geschlossenen, inaktivierten) Ionenkanal.

Die Aktivierung von Kaliumkanälen basiert auf zwei grundlegenden Gating-Mechanismen, die deren Öffnung steuern: die Erweiterung des „unteren“ Gates (sog. Helix-Bundle Crossing) am intrazellulären Poreneingang, wie sie von K_{ir} - und K_v -Kanälen genutzt wird, sowie die Aktivierung eines Selektivitätsfilter-Gates. Die derzeitige Hypothese ist, dass der BK_{Ca} -Kanal sowohl ein zytoplasmatisches Gate an der HBC-Region als auch ein Selektivitätsfilter-Gate besitzt (Chen, Yan, & Aldrich, 2014; Horrigan & Aldrich, 2002; Jia et al., 2018; Magleby, 2003; Schewe et al., 2019; Wilkens & Aldrich, 2006; Y. Zhou, Xia, & Lingle, 2011). Darüber hinaus wird auch ein hydrophober Gating-Mechanismus in der tiefen Porenregion des BK_{Ca} -Kanals diskutiert (Jia et al., 2018). Die Aktivierung des oberen Gates, des Selektivitätsfilters, wurde in den letzten zwei Jahrzehnten für K_{2P} -Kanäle angenommen (Bagriantsev, Peyronnet, Clark, Honore, & Minor, 2011; Niemeyer, Cid, Gonzalez, & Sepulveda, 2016). Neelsen et al. (2024) konnten in den kürzlich aufgelösten Cryo-EM-Strukturen von TASK-1 und TASK-2 auch ein zytoplasmatisches Gate nachweisen. Funktionell konnten sie nachweisen, wie die Bindung von Ionen im Selektivitätsfilter auch die Öffnung eines zytoplasmatischen Gates im K_{2P} -Kanal TALK-2 beeinflusst. Stimuli, die den Selektivitätsfilter öffneten (pH-Wert, Rubidium, Membrandepolarisation), konnten auch das zytoplasmatische Gate öffnen. Umgekehrt erleichterte die Öffnung des unteren Gates das Öffnen des Selektivitätsfilters. In hERG-Kanälen koexistieren das Helix-Bundle Crossing und das Gate innerhalb des Selektivitätsfilters (Smith, Baukrowitz, & Yellen, 1996; Vandenberg, Perozo, & Allen, 2017).

1.2.3 Physiologie und Pathophysiologie

Physiologie

Der BK_{Ca} -Kanal wird im Nervensystem, in der Muskulatur, im Knochen, im Verdauungs- und Harntrakt, im endokrinen, im reproduktiven sowie im kardiovaskulären System exprimiert. Der BK_{Ca} -Kanal reguliert viele zelluläre Funktionen wie die neuronale Erregbarkeit, die Repolarisation des Aktionspotentials, die Neurotransmitter- und Hormonfreisetzung, die Einstellung der Cochlea-Haarzellen, die angeborene Abwehr, den transepithelialen Transport,

den Tonus der glatten Muskulatur im vaskulären, uterinen und gastrointestinalen Trakt sowie in der Harnblase (Bentzen et al., 2007). Während eines Aktionspotentials wird der BK_{Ca} -Kanal durch Membrandepolarisation und einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert und generiert durch ausströmende Kaliumionen eine Hyperpolarisation und eine abnehmende Erregbarkeit der Zelle (siehe Abbildung 2). Der BK_{Ca} -Kanal stellt somit einen negativen Feedback-Mechanismus für Kalziumeinstrom in die Zelle dar (Bailey et al., 2019; Bentzen et al., 2007). In den meisten neuronalen und muskulären Zellen reduziert die BK_{Ca} -Kanal Aktivierung die neuronalen Feuerungsraten, die präsynaptische Neurotransmitterfreisetzung sowie die Muskelkontraktion und den Muskeltonus (Contet, Goulding, Kuljis, & Barth, 2016; Jaggar, Porter, Lederer, & Nelson, 2000; Tricarico & Mele, 2017).

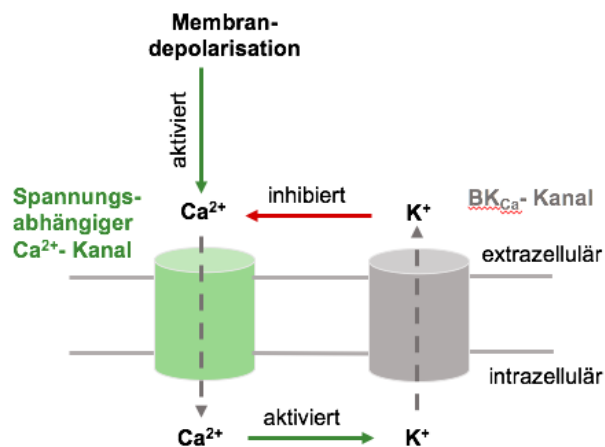


Abbildung 2: Darstellung des Mechanismus der negativen Rückkopplung durch den BK_{Ca} -Kanal. Membrandepolarisation aktiviert spannungsabhängige Kalziumkanäle, wodurch Kalzium in die Zelle einströmt. Die resultierende intrazelluläre Kalziumerhöhung und die Membrandepolarisation aktivieren den BK_{Ca} -Kanal. Kalium strömt aus dem Intrazellulärraum in den Extrazellulärraum und führt zur Repolarisation des Membranpotentials.

Pathophysiologie

KCNMA1-Knockout-Mäuse zeigen multiple Phänotypen wie Ataxie (Sausbier et al., 2004), einen verschlechterten zirkadianen Rhythmus (Montgomery, Whitt, Wright, Lai, & Meredith, 2013), ein reduziertes Körpergewicht mit einem höheren Körperfettanteil (Halm, Bottomley, Almutairi, Di Fulvio, & Halm, 2017), eine Hyperkontraktilität der glatten Muskulatur, die zu Harninkontinenz (Meredith, Thorneloe, Werner, Nelson, & Aldrich, 2004) und erektiler Dysfunktion (Werner, Zvara, Meredith, Aldrich, & Nelson, 2005) führt, eine beeinträchtigte Docosahexaensäure (DHA)-vermittelte Blutdrucksenkung (Hoshi, Wissuwa, et al., 2013), eine beeinträchtigte Speichelsekretion (Romanenko, Nakamoto, Srivastava, Melvin, & Begenisich, 2006) und eine reduzierte Sinusknoten-Feuerungsrate (Imlach, Finch, Miller, Meredith, & Dalziel, 2010).

Mutationen des KCNMA1-Gens, welches für die α -Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals kodiert, werden mit neurologischen Veränderungen wie epileptischen Anfällen, Bewegungseinschränkungen, Entwicklungsstörungen und geistiger Behinderung assoziiert (Bailey et al., 2019). Eine Übersicht über die verschiedenen Phänotypen der KCNMA1-spezifischen Kanalopathie findet sich in Abbildung 3.

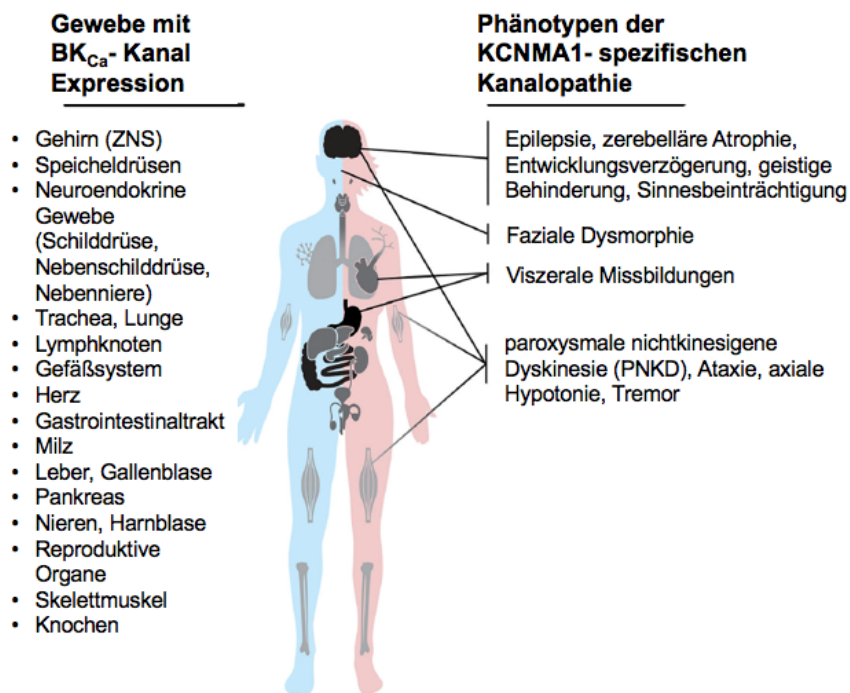


Abbildung 3: BK_{Ca}-Kanal Expression im menschlichen Gewebe und Phänotypen der KCNMA1-spezifischen Kanalopathie. Schwarz markierte Gewebe (zentrales Nervensystem, Gastrointestinaltrakt, reproduktive Organe) zeigen eine hohe BK_{Ca}-Kanal Expression, dunkelgrau markierte Gewebe (Speicheldrüsen, neuroendokrine Drüsen, Herz, Blase, Leber, Gallenblase, Milz, Immunsystem) zeigen eine mittlere BK_{Ca}-Kanal Expression und hellgrau markierte Gewebe (Lunge, Lymphknoten, Gefäßsystem, Skelettmuskulatur, Knochen) zeigen eine niedrige BK_{Ca}-Kanal Expression (Bailey et al., 2019).

Bisher wurden 16 Mutationen des KCNMA1-Gens in der Literatur beschrieben, welche sich phänotypisch unterschiedlich äußern, aber als Kollektiv der KCNMA1-spezifischen Kanalopathie zugeschrieben werden. Die Mutationen beeinflussen die Funktion des BK_{Ca}-Kanals in unterschiedlichem Ausmaß: Es wird zwischen einer abnormalen, verstärkten Funktion des Kanals (Gain-of-Function, GOF), dem Verlust der Funktion (Loss-of-Function, LOF) und Varianten von unbekannter Signifikanz (variants of unknown significance, VUS) unterschieden (Bailey et al., 2019). Eine Übersicht über die KCNMA1-Genmutationen, ihrer Lokalisation im Genprodukt, der α -Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals, sowie ihre Auswirkungen auf die Funktion des BK_{Ca}-Kanals sind dargestellt in Abbildung 4.

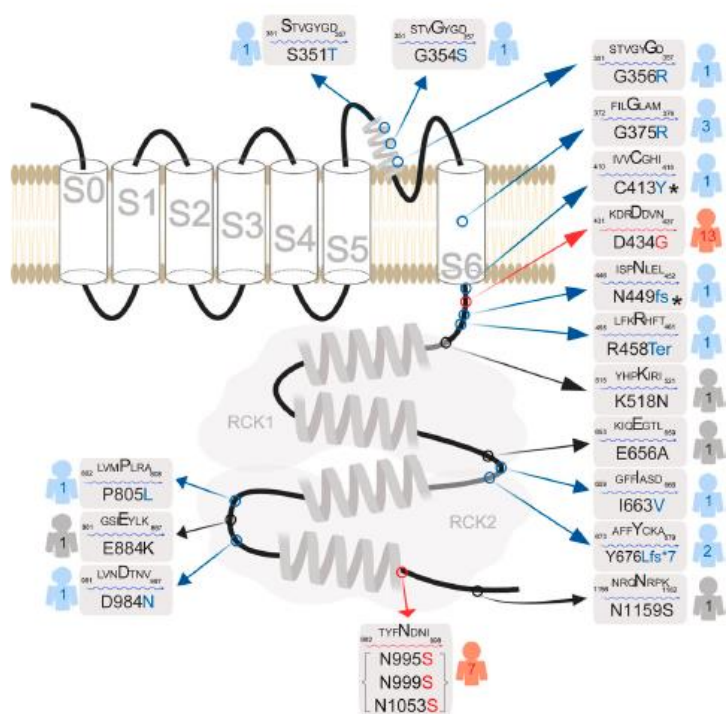


Abbildung 4: Menschliche KCNMA1-Mutationen.

Schematische Darstellung des KCNMA1-Genprodukts, der α -Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals. Dargestellt sind die TM-Domänen S0-S6, S1-S4 bilden die spannungsvermittelnde Domäne; S5, S6 bilden die Poren-Domäne; RCK1 und RCK2 befinden sich intrazellulär. Rot dargestellt sind die GOF-Mutationen (n=2), blau dargestellt sind die LOF-Mutationen (n=11), schwarz dargestellt sind die gutartigen Mutationen (n=3) oder die Varianten von unbekannter Signifikanz (n=1). Die Zahl neben den Mutationen gibt die Anzahl der jeweils betroffenen Patienten an (Bailey et al., 2019).

Die D434G KCNMA1-Mutation betrifft eine Familie von 13 Personen und wurde autosomal dominant vererbt (Du et al., 2005). Die Mutante D434G zeigt mit einer zunehmenden Offenwahrscheinlichkeit, einer schnelleren Aktivierung, einer langsameren Deaktivierung sowie einer zunehmenden Ca²⁺-Sensitivität eine abnormale, verstärkte Funktion des BK_{Ca}-Kanals. Die veränderte BK_{Ca}-Kanal Aktivität sorgt für eine zunehmende Hyperpolarisation der Zelle (Bailey et al., 2019). Sieben der 13 Patienten zeigten das Symptom der paroxysmalen nichtkinesigenen Dyskinesie (PNKD), ein Patient litt unter Epilepsie und fünf Patienten zeigten beide Symptome (Du et al., 2005).

Die N995S/N999S/N1053S KCNMA1-Mutation betrifft sieben Patienten. Sie ist ebenfalls eine GOF-Mutation und zeigt ähnliche Effekte auf die BK_{Ca}-Kanal Aktivität wie die D434G Mutation. Vier von sieben Patienten zeigten das Symptom der paroxysmalen nichtkinesigenen Dyskinesie, zwei Patienten litten unter Epilepsie und ein Patient zeigte beide Symptome. Alle sieben Patienten zeigten Entwicklungsstörungen, drei waren geistig behindert. Die D434G und die N995S/N999S/N1053S KCNMA1-Mutationen repräsentieren gemeinsam den Phänotyp MIM #609446 („PNKD3“) (Bailey et al., 2019).

Die Y676Lfs*7 KCNMA1-Mutation ist eine LOF-Mutation, betrifft zwei Geschwister und wurde autosomal rezessiv vererbt. Phänotypisch äußerte sich die Mutation in Epilepsie, in schwerer geistiger Behinderung sowie in einer Kleinhirnatrophie. Eine paroxysmale nichtkinesigene Dyskinesie wurde nicht nachgewiesen (Tabarki, AlMajhad, AlHashem, Shaheen, & Alkuraya, 2016).

Die G375R KCNMA1-Mutation ist eine LOF-Mutation und ist bei drei, nicht verwandten Patienten nachgewiesen worden. Alle drei Patienten waren von einem Missbildungssyndrom betroffen, welches Gesichtsdysmorphismus, viszerale Fehlbildungen, Entwicklungsstörungen, geistige Behinderung sowie Muskelhypotonie umfasste. Zwei von ihnen hatten epileptische Anfälle, ein Patient litt unter einer Hirn- und Kleinhirnatrophie (Liang et al., 2019).

Die R458Ter, G354S, S351Y, G356R, C413Y/N449fs, I6663V, P805, E,884K, D98N KCNMA1-Mutationen wurden jeweils nur bei einem Patienten festgestellt (Bailey et al., 2019). Sieben von neun Patienten zeigten Bewegungsstörungen, zwei Patienten litten unter epileptischen Anfällen, neun Patienten hatten Entwicklungsstörungen, sieben Patienten waren geistig behindert und vier Patienten wiesen eine Kleinhirnatrophie auf. Neu auftretende Symptome waren Autismus und Areflexie (Liang et al., 2019).

Die K518N, E656A, N1159S KCNMA1-Mutationen wurden als Varianten mit unbekannter Signifikanz eingestuft. Alle drei Patienten zeigten Symptome der Epilepsie (Bailey et al., 2019).

Der KCNMA1-spezifischen Kanalopathie sind verschiedene Phänotypen zuzuordnen. Ein vorherrschender Phänotyp der KCNMA1-spezifischen Kanalopathie sind Bewegungsstörungen, welche die paroxysmale nichtkinesigene Dyskinesie (GOF), Ataxie, Muskelhypotonie und Tremor (LOF) umfassen (Bailey et al., 2019). Ein weiteres vorherrschendes Symptom sind Krampfanfälle. Sie werden mit GOF- und LOF-Mutationen assoziiert. So hatten insgesamt 18 von 37 Patienten beider Gruppen Krampfanfälle. GOF- und LOF-Mutationen zeigten überlappende Krampfanfall-Phänotypen: myoklonische Epilepsie (X. Li et al., 2018; Tabarki et al., 2016), tonisch-klonische Epilepsie (Bailey et al., 2019; Du et al., 2005; Tabarki et al., 2016; Yesil et al., 2018) und Epilepsie mit Absencen. Auffällig war hier, dass neun von neun Patienten mit GOF-Mutationen Epilepsie mit Absencen hatten, bei den LOF-Mutationen waren es nur drei von sechs Patienten (Bailey et al., 2019; Du et al., 2005; X. Li et al., 2018; Liang et al., 2019; Yesil et al., 2018). GOF- und LOF-Mutationen äußerten sich

phänotypisch in Entwicklungsstörungen und geistiger Behinderung. Einige, das Nervensystem betreffende, Symptome wie Schwerhörigkeit, Sehstörungen (Nystagmus, Strabismus, Kolobom der Makula) und Autismus konnten nur den Loss-of-Function-Mutationen zugeordnet werden (Bailey et al., 2019).

1.2.4 Pharmakologie

Die multiplen Krankheitsbilder, die durch pathologische BK_{Ca}-Kanal Funktionen hervorgerufen werden, machen den BK_{Ca}-Kanal zu einem zentralen Ziel der pharmakologischen Therapie.

1.2.4.1 BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren

BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren bewirken einen dämpfenden Effekt auf die zelluläre elektrische Aktivität und zeigen Potential in der Behandlung von Krankheiten wie Epilepsie, Ataxie oder ischämischen Perfusionsstörungen. Folglich wurden viele BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren entwickelt. Die Aktivatoren umfassen ein weites Spektrum an Strukturen mit unterschiedlichen Pharmakophoren, deren Bindungsstellen und präzise Wirkmechanismen größtenteils noch nicht bekannt sind, was die Entwicklung eines rationalen Wirkstoffdesigns erschwert.

Es werden endogene, natürlich vorkommende und synthetisch hergestellte BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren unterschieden.

Endogene BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren

Zu den endogenen BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren gehören unter anderem Kalzium, Magnesium (Mg²⁺), Kohlenmonoxid (Yang et al., 2015), Metaboliten von Cytochrom P450, Arachidonsäure, Epoxygenase, Lipxygenase (Feletou, 2009; Hou, Heinemann, & Hoshi, 2009), das Sexualhormon 17-Beta-Östradiol (Valverde et al., 1999), das im Zuge der Immunantwort verstärkt gebildete antimikrobielle Peptid Beta-Defensin 2 (Bentzen, Olesen, Ronn, & Grunnet, 2014) sowie die Omega-3-Fettsäure Docosahexaensäure (Hoshi, Xu, Hou, Heinemann, & Tian, 2013).

Kalzium

Unter physiologischen Bedingungen ist intrazelluläres Kalzium der wichtigste BK_{Ca}-Kanalregulator und aktiviert den BK_{Ca}-Kanal im Bereich von 100 nM bis 300 µM (Yang et al., 2015).

In der zytosolischen Domäne einer α -Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals finden sich zwei hoch-affine Kalziumbindungsstellen. Eine Bindungsstelle befindet sich im C-Terminus von RCK2 und enthält ein asparaginsäurereiches Sequenzmotiv, welches als Ca²⁺-bowl bezeichnet wird (Schreiber & Salkoff, 1997). Wenn Kalzium an dieser Stelle bindet, wiegen saure Aminosäure-Seitenketten und Carbonylgruppen einer α -Untereinheit das Kalziumion von einer Seite, während die Ionenkoordination von einem Asparagin-Rest (D348) der RCK1 N-lobe (auch bekannt als AC-Regionen, β A- α C) der benachbarten α -Untereinheit vervollständigt wird. Die zweite Kalziumbindungsstelle liegt zwischen der RCK1 N-lobe und der restlichen RCK1-Domäne derselben α -Untereinheit. Wenn Kalzium an dieser Bindungsstelle bindet, umgeben die sauren Aminosäuren-Seitenketten und die Carbonylgruppen der RCK1-Domäne größtenteils das Kalziumion, aber auch hier wird die Ionenkoordination durch den Beitrag eines Aspartat-Restes (D356) der RCK1 N-lobe vervollständigt. Die Ca²⁺-Koordination verschiebt die Position der RCK1 N-lobe hin zur geöffneten Konformation. Diese Konformationsänderung der RCK1 N-lobe komplettiert beide Kalziumbindungsstellen. Außerdem findet eine Interaktion zwischen beiden Kalziumbindungsstellen über R503 in RCK1 und E912 und Y914 der Ca²⁺-bowl statt (Hite et al., 2017).

Die kalziuminduzierte Konformationsänderung innerhalb der Gating-Ring-Struktur kann die Pore des BK_{Ca}-Kanals über verschiedene Wege beeinflussen: Zum einen direkt über Polypeptidlinker, die die RCK1 N-lobe und die S6 Helices miteinander verbinden, zum anderen über indirekte Verbindungen, die die RCK1 N-lobe und die spannungsvermittelnde Domäne sowie den S4-S5 Linker der benachbarten α -Untereinheit miteinander verbinden. Umgekehrt können auch Bewegungen der S4 Helices die Position der RCK1 N-lobe und somit das Gating-Verhalten beeinflussen. Die Kalziumbindungsstellen und die spannungsvermittelnde Domäne können Einfluss auf die Position der RCK1 N-lobe haben, welche somit beide BK_{Ca}-Kanalregulatoren funktionell miteinander verbindet (Hite et al., 2017).

Magnesium

Die niedrig-affine (im mM Bereich) Mg²⁺-abhängige BK_{Ca}-Kanal Aktivierung ist unabhängig von der hoch-affinen Aktivierung durch Kalzium (Yang et al., 2015). Die Aminosäuren E374 und E399 des N-Terminus der RCK1 Domäne und D99 und N172 der S0 Helix und des S2-S3 Linkers bilden im Raum zwischen der spannungsvermittelnden Domäne und der zytosolischen Domäne gemeinsam die Magnesiumbindungsstelle (siehe Abbildung 5). Die

spannungsvermittelnde Domäne und die zytosolische Domäne stammen jeweils von benachbarten α -Untereinheiten des BK_{Ca}-Kanals (Yang et al., 2008; Yang et al., 2015).

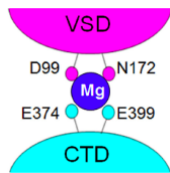


Abbildung 5: Mg²⁺-abhängige Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals. Die Magnesiumbindungsstelle besteht aus D99 und N172 der spannungsvermittelnden Domäne und E374 und E399 der zytosolischen Domäne. Die VSD und CTD stammen von benachbarten α -Untereinheiten (Yang et al., 2015).

Docosahexaensäure

Der endogene BK_{Ca}-Kanal Aktivator Docosahexaensäure ist eine mehrfach ungesättigte Omega-3-Fettsäure, die in Fischöl vorkommt und das kardiovaskuläre Erkrankungsrisiko reduziert (Tian et al., 2016). Der BK_{Ca}-Kanal wird potent und reversibel durch die Docosahexaensäure aktiviert. Der Effekt von DHA ist abhängig von einem Tyrosinrest (Y318) in der Transmembran-Domäne S6 des BK_{Ca}-Kanals. Die negative Carboxylatgruppe der Docosahexaensäure und die OH-Gruppe von Y318 interagieren miteinander (Tian et al., 2016). Die Mutante Y318S hebt die aktivierende Wirkung der Docosahexaensäure auf (Hoshi, Xu, et al., 2013).

Natürlich vorkommende BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren

Zu den natürlich vorkommenden BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren gehören Rottlerin (Mallotoxin), ein Produkt des Kamalabaums (Zakharov, Morrow, Liu, Yang, & Marx, 2005) und Soyasaponin (Rockman et al., 2020).

Synthetische BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren

Zu den synthetischen Aktivatoren gehören unter anderem synthetische Benzimidazol-Derivate (NS004, NS1619), Biaryl-Amine (Flufenaminsäure), Biaryl-Harnstoffe (NS1608), Biaryl-Thioharnstoffe (NS11021), Aryl-Oxindole (BMS-204352), Aryl-Pyrrole (NS8), Indol-3-Carboxylate (CGS-7184, CGS-7181) sowie die GoSlo-SR Familie (Gessner et al., 2012; Roy et al., 2012).

NS11021

Der als selektiv beschriebene BK_{Ca}-Kanal Aktivator NS11021 aktiviert den BK_{Ca}-Kanal sehr potent. Bereits geringe mikromolare Konzentrationen reichen zur Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals aus. Die Aktivierung kann von extra- und intrazellulär erfolgen und den BK_{Ca}-Kanal in seinem

offenen und geschlossenen Konformationszustand beeinflussen. Die BK_{Ca}-Kanal Aktivierung erfolgt unabhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration. Es kommt zu einer zunehmenden Offenwahrscheinlichkeit des Kanals, ohne die Einzelleitfähigkeit zu beeinflussen (Bentzen et al., 2007; Rockman et al., 2020). In vorangegangenen Studien wurden die vasodilatatorischen Effekte von NS11021 zur Behandlung von ischämischen Perfusionsstörungen und erektilen Dysfunktionen in Tierversuchen genutzt (Bentzen et al., 2007; Bentzen et al., 2014; Rockman et al., 2020).

GoSlo-SR-5-6

GoSlo-SR-5-6 ist ein effizienter BK_{Ca}-Kanal Aktivator, der die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals erhöht. Die Arbeitsgruppe um Webb et al. (2015) identifizierte die Bindungsstelle des Pharmakons. Sie zeigten eine verringerte Wirkung von GoSlo-SR-5-6 auf die Slo1_9A Spleißvariante, welche ein alternatives Exon 9 mit 13 veränderten Aminosäuren in der S6/RCK1-Linker-Region enthielt. Die Herstellung von Chimären, in denen die Transmembran-Domäne S6C, der proximale und der distale Linker zwischen WT und Slo1_9A ausgetauscht wurden, zeigte nur in der veränderten TM-Domäne S6C (A99) einen verringerten Effekt durch GoSlo-SR-5-6. Die Aminosäuren S317, I323 und E324 unterschieden sich in der TM-Domäne S6C der Slo1_9A Spleißvariante von der des Wildtyps. Der Effekt von GoSlo-SR-5-6 auf die Mutante S317R war deutlich reduziert, der Effekt auf die Mutante S317A war unverändert. Webb et al. vermuteten, dass S317 mit anderen Aminosäuren während der GoSlo-SR-5-6-Bindung interagiert. Mithilfe der Kristallstruktur Kv1.2/2.1 konnten sie die Interaktion von S317 mit benachbarten Segmenten innerhalb der Kristallstruktur identifizieren (I323, I326 in S6C; L227A im S4/S5- Linker). Die Mutanten I326A und L227A zeigten eine verringerte Aktivierung durch GoSlo-SR-5-6. Die Triple-Mutante (S317R:L227A:I326A) hat den aktivierenden Effekt von GoSlo-SR-5-6 vollständig aufgehoben (Webb et al., 2015).

1.2.4.2 BK_{Ca}-Kanal Inhibitoren

Der BK_{Ca}-Kanal wird inhibiert von quartären Ammoniumionen (QA⁺), den Skorpiongiften Iberiotoxin und Charybdotoxin, 4-Aminopyridin und Chinidin (Q. Y. Tang, Zhang, Xia, & Lingle, 2010), extrazellulärer Versäuerung (Y. Zhou, Xia, & Lingle, 2018) und durch Häm (X. D. Tang et al., 2003).

Quartäre Ammoniumverbindungen

Quartären Ammoniumverbindungen, wie Tetraethylammonium (TEA), Tetrapentylammonium (TPenA), Tetrahexylammonium (THexA), Tetrabutylammonium (TButA) oder Tetraheptylammonium (THepA), wurde schon früh ein inhibitorischer Effekt auf Kaliumkanäle zugeschrieben (Armstrong, 1966). Seitdem werden die quartären Ammoniumionen als Tool zur Bestimmung der Porenweite und Statur von Kaliumkanälen genutzt.

Die quartären Ammoniumverbindungen etablierten sich als Inhibitoren, die den Kaliumkanal nur in seiner geöffneten Konformation inhibieren können (open-channel blockers). Die quartären Ammoniumverbindungen erreichen demnach ihre Bindungsstelle nur, wenn sich das untere Gate am intrazellulären Poreneingang im geöffneten Zustand befindet (Thompson & Begenisich, 2012). Wesentliche Merkmale dieser zustandsabhängigen Inhibition durch quartäre Ammoniumverbindungen, die bei allen K_{ir} - und K_v -Kanälen beobachtet wurde, wurden bereits von Armstrong (1971) wie folgt beschrieben: (a) zeitabhängige Inhibition: die QA^+ -Moleküle gelangen nur in den Kaliumkanal, wenn sich das Gate im geöffneten Zustand befindet, (b) eine Verlangsamung des Deaktivierungsprozesses während der Repolarisation, (c) eine Hyperpolarisation hilft, um QA^+ -Moleküle vom Kanal zu lösen, (d) eine Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration unterstützt ein Lösen der QA^+ -Moleküle vom Kanal.

Es ist lange bekannt, dass auch BK_{Ca} -Kanäle durch intrazelluläre quartäre Ammoniumverbindungen inhibiert werden (Villaruel, Alvarez, Oberhauser, & Latorre, 1988; Yellen, 1984). Faszinierenderweise wurde die BK_{Ca} -Kanal Inhibition durch moderat große quartäre Ammoniumverbindungen, wie Tetrabutylammonium (TButA) oder Tetraethylammonium (TEA), als zustandsunabhängig beschrieben und beruht demnach nicht auf der Offenwahrscheinlichkeit des BK_{Ca} -Kanals. Auch hat die Bindung der moderat großen QA^+ -Moleküle keinen Einfluss auf die Deaktivierungszeit des BK_{Ca} -Kanals während der Repolarisation. Das Schließen des Gates wird beim BK_{Ca} -Kanal nicht durch die Anwesenheit der moderat großen quartären Ammoniumverbindungen beeinflusst und stellt keine signifikante Barriere für die Inhibitoren-Bindung dar (W. Li & Aldrich, 2004; Wilkens & Aldrich, 2006). Die Inhibition des BK_{Ca} -Kanals durch das sperrige Shaker ball-Peptid (ShBP) ist hingegen zustandsabhängig. Der Zugang für größere Moleküle, wie dem ShBP, wird im geschlossenen Konformationszustand des BK_{Ca} -Kanals verwehrt (W. Li & Aldrich, 2006). Eine Erklärung für die Beobachtung, dass moderat große quartäre Ammoniumverbindungen ungehindert Zugang zur tiefen Porenregion haben, um den Kanal auch im geschlossenen

Konformationszustand zu inhibieren, ist eine von intrazellulär physikalisch offene Pore mit einem Radius von ~ 6 Å (Jia et al., 2018).

Die Bindungsstelle der quartären Ammoniumverbindungen ist bereits identifiziert worden und befindet sich unmittelbar unterhalb des inneren Eingangs zum Selektivitätsfilter (Lenaeus, Burdette, Wagner, Focia, & Gross, 2014).

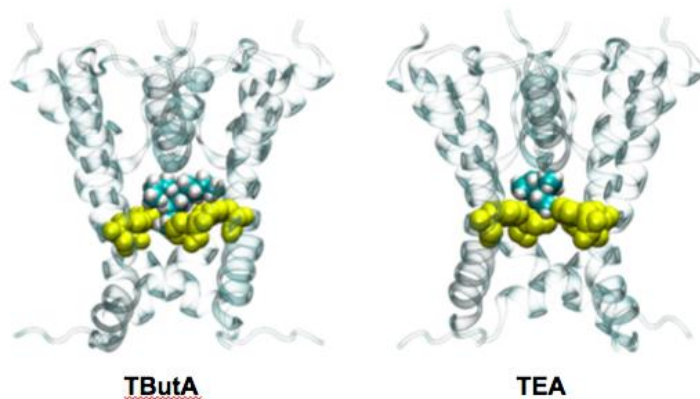


Abbildung 6: Repräsentative Bindungskonformationen von Tetrabutylammonium und Tetraethylammonium in der tiefen Porenregion des BK_{Ca}-Kanals. TButA- und TEA-Moleküle sind türkis als van-der-Waals-Sphären dargestellt. Die S6 Helices von drei α -Untereinheiten des BK_{Ca}-Kanals sind transparent dargestellt, F315A wird dargestellt als gelbe van-der-Waals-Sphären. Die Darstellungen stammen von Umbrella-Sampling-Simulationen. TButA und TEA sind ~ 8 Å vom Massenzentrum des Selektivitätsfilters des BK_{Ca}-Kanals entfernt (Jia et al., 2018).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die pharmakologische Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Regulation der zellulären Erregbarkeit dar, insbesondere in der Behandlung von Krankheiten wie Epilepsie, ischämischen Perfusionsstörungen, Harninkontinenz oder erektiler Dysfunktion. Folglich wurden viele Aktivatoren entwickelt, um selektive und hochaffine BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren zu identifizieren. Die Aktivatoren umfassen ein weites Spektrum an Strukturen mit unterschiedlichen Pharmakophoren, deren Bindungsstellen und präzise Wirkmechanismen größtenteils noch nicht bekannt sind, was die Entwicklung eines rationalen Wirkstoffdesigns erschwert.

Mein Bestreben war es, Aktivatoren mit strukturellen Ähnlichkeiten, sog. negativ geladene Aktivatoren (negatively charged activators, NCAs), hinsichtlich ihrer Wirkung auf den BK_{Ca}-Kanal zu untersuchen und ihren gemeinsamen Wirkmechanismus und Bindungsort zu identifizieren. Hierfür habe ich mir die auf den BK_{Ca}-Kanal inhibierend wirkenden quartären Ammoniumverbindungen und ihre bereits identifizierte Bindungsstelle unmittelbar unterhalb des Selektivitätsfilters in der inneren Pore des BK_{Ca}-Kanals zunutze gemacht (Lenaeus et al., 2014). Mittels der elektrophysiologischen Patch-Clamp-Methode habe ich QA⁺-Kompetitionsversuche durchgeführt, um eine mögliche gemeinsam genutzte Bindungsstelle der negativ geladenen Aktivatoren und der quartären Ammoniumverbindungen zu überprüfen.

Die derzeitige Hypothese ist, dass der BK_{Ca}-Kanal sowohl ein zytoplasmatisches Gate an der HBC-Region als auch ein Selektivitätsfilter-Gate besitzt (Schewe et al., 2019; Wilkens & Aldrich, 2006; Y. Zhou et al., 2011). Allerdings wird auch ein hydrophober Gating-Mechanismus in der tiefen Porenregion des BK_{Ca}-Kanals diskutiert. Ob und in welchem Ausmaß diese verschiedenen Mechanismen zur Kanalaktivierung beitragen, ist noch nicht abschließend geklärt und stellt eine wichtige Fragestellung der aktuellen Forschung dar. Auch in dieser Arbeit möchte ich dieser Fragestellung nachgehen und dazu beitragen, das Gating-Verhalten des BK_{Ca}-Kanals besser zu verstehen. Das Selektivitätsfilter-Gate ist eng gekoppelt mit der Ionenpermeation (McCoy & Nimigean, 2012; Schewe et al., 2016). In K_{2P}-Kanälen und hERG-Kanälen, die beide mitunter ein Selektivitätsfilter-Gate besitzen, führte diese Kopplung zu einer ausgeprägten Aktivierung durch Rubidiumionen. Im Gegensatz dazu zeigt Rb⁺ keinen aktivierenden Effekt auf K⁺-Kanäle, die am Helix-Bundle Crossing geschaltet werden, wie K_{ir}- und die meisten K_v-Kanäle (Schewe et al., 2019). In dieser Arbeit wollte ich untersuchen, ob

Rubidiumionen auch eine Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals verursachen und somit ein Hinweis für ein Selektivitätsfilter-Gate im BK_{Ca}-Kanal sind. Zur Untersuchung eines Gates am zytoplasmatischen Poreneingang, ähnlich dem Helix-Bundle Crossing, ist in dieser Arbeit zudem ein Teil der porenbildenden S6-Helix, die einerseits distal in ein unteres Gate übergeht und gleichzeitig als gating-relevanter Abschnitt beschrieben ist (Chen et al., 2014; Y. Zhou et al., 2011), untersucht worden.

2. Material und Methoden

In dieser Arbeit wurde die α -Untereinheit des mBK_{Ca} -Kanals (GenBank-Nummer: NM_001253378.1) Ableitungen untersucht. Die Messung der BK_{Ca} -Kanalströme erfolgte mittels der Patch-Clamp-Methode, die erstmals von Neher and Sakmann (1976) beschrieben und 1991 mit dem Medizinnobelpreis gewürdigt wurde. Als Expressionssystem wurden Oozyten der Krallenfroschart *Xenopus laevis* gewählt, in die in vitro synthetisierte RNA des zu untersuchenden BK_{Ca} -Kanals injiziert wurde.

2.1 Mutagenese und RNA-Synthese

Die RNA-Synthese wurde mittels in vitro-Transkription durch die labortechnischen Assistenten/-innen der Arbeitsgruppe durchgeführt. Grundlage hierfür war das Vorliegen eines Templates mit der gewünschten DNA-Sequenz. Hierbei konnte es sich entweder um ein Plasmid oder um ein Produkt der Polymerase-Kettenreaktion handeln. Die Plasmid-DNA wurde in chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) transformiert. Die transformierten *E. coli* wurden zum Zweck der selektiven Vermehrung auf LB-Agars (Luria/Miller) mit Ampicillin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert. Eine Flüssigkultur wurde angeimpft und im Inkubator über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Plasmid-DNA wurde nach der Zentrifugation und Bakterienernte mithilfe eines Maxiprep-Kits (Katalognummer K0491) isoliert, welches von Thermo Fisher Scientific aus Massachusetts, USA, stammt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mithilfe einer Restriktionsendonuklease linearisiert und unter Zuhilfenahme eines Reinigungskits (Nucleo Spin Gel und PCR-Clean-Up Columns, REF 740609, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gereinigt.

Die in vitro-Transkription erfolgte unter Verwendung des mMESSAGING mMACHINE SP6 Transkriptionskits (Katalognummer: AM1340, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland). Die RNA wurde von der RNA-Polymerase aus einem linearisierten DNA-Template synthetisiert. Im Anschluss wurde die RNA gereinigt und das RNA-Pellet in RNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bei 260 nm (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemessen und die RNA bei -20 °C bis zur Injektion gelagert. Nach jedem beschriebenen Schritt wurde die RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

Die Einführung gezielter Mutationen von DNA-Sequenzen innerhalb eines Gens ermöglicht die Mutagenese-Polymerase-Kettenreaktionen. Dabei wurden Primer verwendet, die die auszutauschende Aminosäure enthielten. Nach der Polymerase-Kettenreaktion wurde die doppelsträngige DNA mittels einer Restriktionsendonuklease verdaut und das Enzym durch Hitzedenaturierung inaktiviert. Die resultierenden Plasmide, die die gewünschte Mutation enthielten, wurden in *Escherichia coli* Bakterien transformiert. Plasmidpräparationen wurden aus den gebildeten Kolonien isoliert und die korrekte Nukleotidsequenz verifiziert. Es erfolgte erneut die in vitro-Transkription zur RNA-Synthese.

2.2 Oozytenpräparation, RNA-Injektion und Expression

Die operative Entnahme der Oozyten des weiblichen Frosches der Gattung *Xenopus laevis* erfolgte in der Arbeitsgruppe zwei Mal wöchentlich durch hierzu befähigte labortechnische Assistent/-innen. Bei jedem Frosch wurde die Oozytenentnahme insgesamt maximal sechsmal durchgeführt. Zwischen den einzelnen Operationen lag mindestens ein Zeitraum von zwölf Wochen. Der jeweilige Frosch wurde vor der Operation durch Hinzugabe des Lokalanästhetikums Tricain in das Wasser des Vorbereitungsbeckens betäubt. Während des operativen Eingriffes wurden die Frösche auf Eis gelagert. Eine kleine abdominale Inzision mit einem sterilen Skalpell ermöglichte die Entnahme der Oozyten. Der Wundverschluss erfolgte mittels einer resorbierbaren Naht. Anschließend wurde der Frosch auf einer künstlichen Seerose in einem Aufwachbecken gelagert, beobachtet und nach dem Erwachen in die Tierhaltung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zurückgegeben.

Die Oozyten wurden manuell geteilt und anschließend für eine Stunde in OR2-Lösung mit Kollagenase Typ-2 unter Schütteln inkubiert. Es folgte eine wiederholende Waschung mit ND96-Lösung, um die Kollagenase-Aktivität zu stoppen. Die Oozyten wurden in ND96-Lösung bei 16 °C im Brutschrank aufbewahrt. Anschließend wurden die Oozyten der Entwicklungsstadien V bis VI nach Dumont (1972) für die RNA-Injektion unter mikroskopischer Vergrößerung selektiert (siehe Abbildung 7). Die äußere Follikelschicht der Oozyten wurde unter Zuhilfenahme von zwei Pinzetten manuell entfernt.

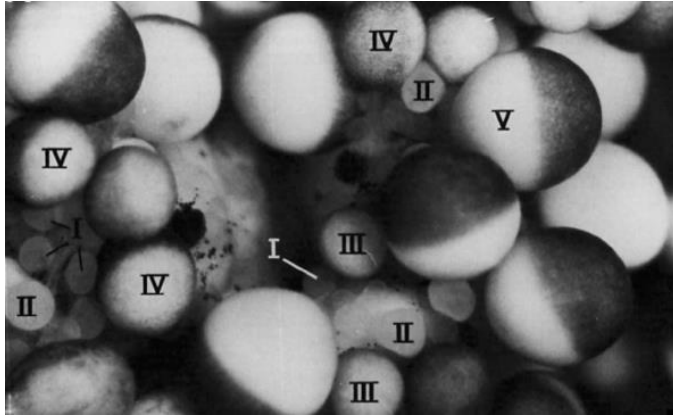


Abbildung 7: *Xenopus laevis* Oozyten in verschiedenen Entwicklungsstadien. Die Entwicklungsstadien der Oozyten sind mithilfe römischer Ziffern I-V dargestellt (Jesus, Munro, & Houliston, 2020).

Vor Beginn der RNA-Injektion wurde das gesamte Arbeitsumfeld gründlich mit RNase-Away gereinigt. Die Injektionspipetten (GB150T-10, Science Products, Hofheim, Deutschland) wurden mittels eines Mikropipetten-Pullers (P-1000, Sutter Instrument, Novato, USA) für die Injektion entsprechend ausgezogen. Anschließend wurde unter mikroskopischer Sicht das Borosilikatglas der Injektionspipetten manuell an einem Platindraht gebrochen. Die RNA wurde mittels RNase-freien Pipetten auf einen sterilen Paraffinfilm aufgetragen und von dort mithilfe einer Injektionsspritze und mikroskopischer Vergrößerung in die zuvor hergestellte Injektionspipette aufgezogen. Mithilfe einer Injektionsspritze wurden etwa 50 nl RNA in den braunen Pol der Oozyten appliziert. Anschließend wurden die Oozyten in mit Testlösung gefüllten Zellkulturplatten (24-Well-TC-Platten, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) überführt und für etwa 24 bis 48 Stunden bei 16 °C im Brutschrank inkubiert.

2.3 Elektrophysiologische Ableitungen (Patch-Clamp-Messungen)

Vor der Durchführung der Patch-Clamp-Messungen zur elektrophysiologischen Untersuchung des BK_{Ca}-Kanals mussten folgende Vorbereitungen getroffen werden: Zunächst mussten Patchpipetten aus Borosilikatglas (GB200-8P, Science Products, Hofheim am Taunus, Deutschland) mittels eines Mikropipetten-Pullers (P-1000, Sutter Instrument, Novato, USA) und DMZ-Universal-Elektroden-Pullers (Zeitz-Instruments, Martinsried, Deutschland) ausgezogen werden. Danach wurden die Patchpipetten unter mikroskopischer Sicht mit einem heißen Draht hitzepoliert, um später bei den Experimenten einen Öffnungswiderstand von 0.2 bis 0.5 MΩ zu erlangen. Die Zellkulturplatte mit den vor einigen Tagen injizierten Oozyten wurde kurz vor Beginn der Patch-Clamp-Experimente aus dem Brutschrank entnommen und die Vitellinmembran einer Oozyte unter mikroskopischer Sicht und unter Zuhilfenahme von zwei Pinzetten entfernt. Die Zellkulturplatte mit den übrigen Oozyten wurde anschließend wieder zurück in den Brutschrank gestellt. Die Patch-Clamp-Messungen erfolgten bei einer

Raumtemperatur von 22-24 °C. Die vorbereitete Oozyte wurde in die Badlösung (120 mM KNO₃, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA; pH 7,4) einer zur Seite mit Kunststoff und nach unten mit einem Deckglas abgeschlossenen Messkammer gelegt. Unterhalb des Glasbodens waren die Objektive eines Lichtmikroskops (Zeiss Axiovert, Carl-Zeiss, Jena, Deutschland). In die mit Badlösung gefüllte Messkammer ragte ein Multibarrelsystem, welches aus zehn Theta-Glasröhrchen bestand. An jedes Röhrchen waren ein dazugehöriges Schlauchsystem und eine Einwegspritze angeschlossen, welche die zu untersuchenden Pharmaka enthielt. Dreiwegehähne ermöglichten einen Applikationsstopp. Eine Applikation von bis zu zehn verschiedenen Pharmaka oder Lösungskonzentrationen auf die zytoplasmatische Seite der Zellmembran war mittels des Applikationssystems möglich. Außerdem war ein Absaugsystem installiert, welches einen kontinuierlichen Abfluss der applizierten Lösungen aus der Messkammer ermöglichte.

Zu Versuchsbeginn wurde die zuvor hitzepolierte Spitze der Patchpipette leicht in Paraffinöl getaucht, um später den elektrischen Kontakt zwischen der Patchpipette und der Oozytenmembran zu optimieren. Das blasenfreie Befüllen der Patchpipette mit Pipettenlösung erfolgte präzise unter Zuhilfenahme einer Einwegspritze mit einem Quarzglas-Filament (MicroFil, World Precision Instruments, Sarasota, USA). Die Pipettenlösung, die die extrazelluläre Seite darstellt, enthielt meist 120 mM KNO₃, 10 mM HEPES und 10 mM EGTA (kalziumfrei). Falls andere Versuchsbedingungen mit einer veränderten Pipettenlösung vorlagen, wurde in den nachfolgenden Experimenten explizit darauf hingewiesen. Die Patchpipette wurde auf die chloridierte Messelektrode des Pipettenhalters des EP10-Vorverstärkers (HEKA Electronics, Lambrecht, Deutschland) aufgesetzt. Die dazugehörige Referenzelektrode befand sich innerhalb der Badlösung. Vorsichtig wurde die eingespannte Patchpipette in die mit Badlösung gefüllte Kammer eingetaucht und, unter Zuhilfenahme eines Mikromanipulators (Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland), an die Zellmembran der Oozyte manövriert. Abbildung 8 zeigt einen Teilausschnitt des Patch-Clamp-Messtandes, an dem die Experimente dieser Arbeit durchgeführt wurden.

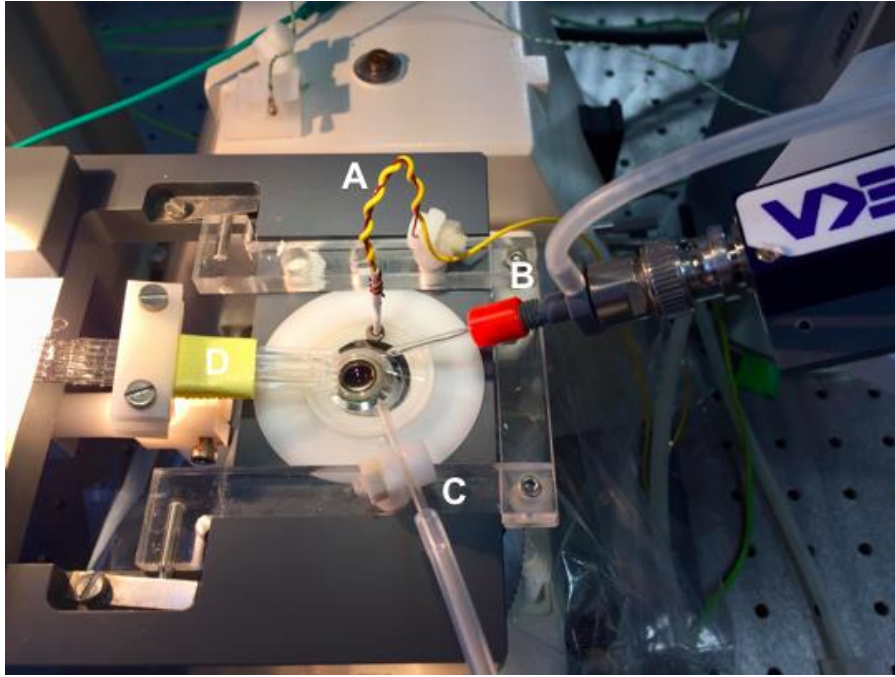


Abbildung 8:
Teilausschnitt des
Patch-Clamp-
Messtandes. Zu sehen ist das von Kunststoff umrandete Deckglas, auf dem die Oozyte platziert wird. Unterhalb des Deckglases sieht man das Objektiv des Lichtmikroskops. (A) Referenzelektrode, (B) Patchpipette, befestigt im Pipettenhalter des EP10-Vorverstärkers, (C) Absaugsystem, (D) Multibarrelsystem, bestehend aus Theta-Glasröhrchen.

Durch leichten Unterdruck entsteht ein Widerstand im Giga-Ohm-Bereich, der die Grundvoraussetzung für einen stabilen Patch darstellt. Bei Vorhandensein eines Widerstandes im Giga-Ohm-Bereich, wurde das Haltepotential auf -80 mV umgestellt und in der On Cell-Konfiguration von -80 mV bis $+80\text{ mV}$ Rampen gefahren. Bei stabilen Strömen wurde anschließend der Patch aus der Oozyte exzidiert und mithilfe des Mikromanipulators in das Applikationssystem manövriert. In der Inside-out-Konfiguration konnten verschiedene Messprotokolle im Datenerfassungsprogramm PatchMaster (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) genutzt werden und bis zu zehn Pharmaka oder Lösungskonzentrationen gelöst in der entsprechenden Badlösung auf die intrazelluläre Seite der Zellmembran appliziert werden. Abbildung 9 stellt den elektrischen Schaltkreis des Patch-Clamp-Messtandes schematisch dar.

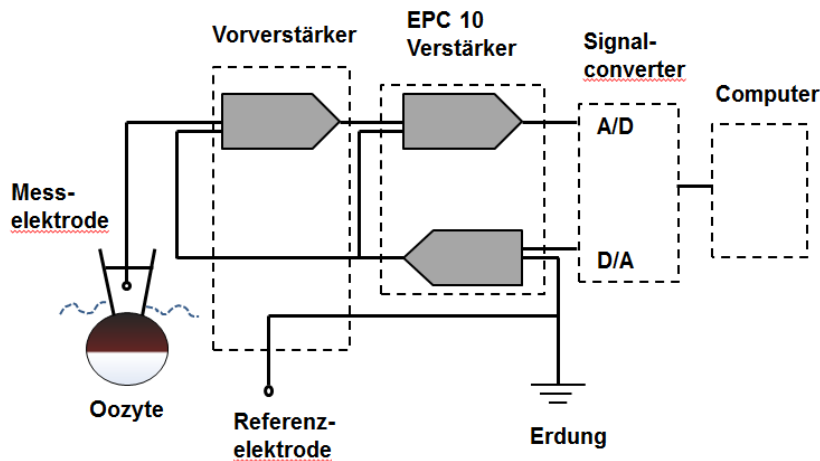


Abbildung 9: Schematische Darstellung des elektrischen Schaltkreises im Patch-Clamp-Experiment. Der geschlossene Schaltkreis zwischen der Mess- und Referenzelektrode wird veranschaulicht.

2.4 Datenerhebung, Statistik und Ergebnisdarstellung

Die elektrophysiologischen Messdaten wurden mit einem EPC-10-USB Patch-Clamp-Verstärker erfasst und über das Datenerfassungsprogramm PatchMaster auf einen Windows-Computer übermittelt und digital dargestellt.

Um die elektrophysiologischen Messungen statistisch auswerten zu können, wurden die aus den elektrophysiologischen Messungen gewonnenen Daten in Microsoft Excel 2011 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) dokumentiert und analysiert. So wurden Einzeldaten normiert und für jede Konzentration der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler (SEM) berechnet. Zusätzlich konnte die durchschnittliche Potenzierung der Stromantwort (fold change) berechnet werden. Die zugehörigen Formeln werden nachfolgend dargestellt:

Mittelwert:

$$MW = \frac{\sum x_i}{n}$$

x_i = Messwert

n = Anzahl der Experimente

Standardabweichung:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - M)^2}{n - 1}}$$

Standardfehler:

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Durchschnittliche Potenzierung der Stromantwort:

$$\text{Durchschnittliche Potenzierung der Stromantwort} = \frac{I_{\max}}{I_{\text{Grundstrom}}}$$

$I_{\text{Grundstrom}}$ = Stromantwort unter Ausgangsbedingungen

I_{\max} = maximale Stromantwort

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Version 6.3.7.2 von Igor Pro (Wavemetrics, Oregon, USA). Die normierten Mittelwerte jeder Konzentration wurden für die Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven übernommen und mittels der Hill-Funktion gefittet.

Hill-Gleichung:

$$I/I_{\max} = \frac{1}{1 + \left\{ \frac{x}{x_{1/2}} \right\}^{\text{HK}}}$$

I = Stromantwort nach Applikation der jeweiligen Konzentration, I_{\max} = maximale Stromantwort, x = Konzentration, $x_{1/2}$ = benötigte Konzentration des Wirkstoffs, um einen halbmaximalen Effekt (EC_{50} bzw. IC_{50}) zu erzielen, HK = Hill-Koeffizient

Um die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) oder die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) einer Substanz zu berechnen, musste für jeden durchgeführten Versuch mit den normierten Messdaten eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt werden. Aus den einzelnen Fit-Operationen wurden erneut der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler in Microsoft Excel berechnet.

2.5 Verwendete Lösungen und Chemikalien

A. Zusammensetzung von Oozyteninkubationslösungen

OR2-Lösung (pH 7,5)

NaCl	82,5 mM
KCl	2 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	5 mM

ND96 (pH 7,5)

NaCl	96 mM
KCl	2 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	5 mM
CaCl ₂	1,8 mM

Testlösung (pH 7,4)

NaCl	54 mM
KCl	30 mM
NaHCO ₃	2,4 mM
MgSO ₄	0,82 mM
CaCl ₂	0,41 mM
Ca (NO ₃) ₂	0,33 mM
Tris	7,7 mM
Penicillin	100 U ml ⁻¹
Streptomycin	100 U ml ⁻¹

B. Zusammensetzung der Badlösung

Kaliumlösung (pH 7,4)

KNO ₃	120 mM
HEPES	10 mM
EGTA	10 mM

C. Zusammensetzung der Pipettenlösungen

Kaliumlösung (pH 7,4)

KNO ₃	120 mM
HEPES	10 mM
EGTA	10 mM

Rubidiumlösung (pH 7,4)

RbNO ₃	120 mM
HEPES	10 mM
EGTA	10 mM

D. Verwendete Chemikalien

- Active Blue 25: CAS-Nummer: 6408-78-2, gelöst in DMSO
- GoSlo-SR-5-6: Natrium 1-amino-4-((3-trifluoromethylphenyl)amino)-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracene-2-sulfonate, bereitgestellt durch Mark Hollywood, gelöst in DMSO
- NS11021: N'-[3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl]-N-[4-bromo-2-(2H-tetrazol-5-yl)phenyl]-thiourea, CAS-Nummer: 956014-19-0, gelöst in DMSO
- NS3623: N-[4-Bromo-2-(1H-tetrazol-5-yl-phenyl)]-N'-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-urea, CAS-Nummer: 343630-41-1, gelöst in DMSO
- PD-118057: 2-[[4-[2-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]phenyl]amino]benzoic acid, CAS-Nummer: 313674-97-4, gelöst in DMSO
- ML67-33: 2,7-Dichloro-9,9-dimethyl-10-[2-(1H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)ethyl]-4a,9a-dihydroacridine, CAS-Nummer: 1443290-89-8, gelöst in DMSO
- Tetrapentylammonium-Chlorid (TPenA), CAS-Nummer: 4965-17-7, gelöst in Wasser
- Tetrahexylammonium-Chlorid (THexA), CAS-Nummer: 4328-13-6, gelöst in Wasser
- Tetraheptylammonium-Chlorid (THepA), CAS-Nummer: 4368-51-8, gelöst in Wasser

Von allen verwendeten Chemikalien wurden Stammlösungen angesetzt, welche bei -80 °C eingefroren und am Tag des Experiments aufgetaut wurden. Die Stammlösungen wurden mit der Badlösung auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde mittels der bereits beschriebenen Patch-Clamp-Methode der Effekt von Rubidiumionen, der BK_{Ca}-Kanal spezifischen Aktivatoren NS11021, GoSlo-SR-5-6 und Active Blue 25, des hERG-Aktivators NS3623 sowie des K_{2P}-Aktivators ML67-33 auf den BK_{Ca}-Kanal untersucht. Die Bindungsstelle der auf den BK_{Ca}-Kanal inhibitorisch wirkenden quartären Ammoniumverbindungen ist bekannt und liegt unmittelbar unterhalb des inneren Eingangs zum Selektivitätsfilter. In dieser Arbeit wurden QA⁺-Kompetitionsversuche durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Aktivatoren NS11021, NS3623, PD-118057, ML67-33 und Active Blue 25 mit der quartären Ammoniumverbindung Tetrahexylammonium um die Bindungsstelle konkurrieren. Des Weiteren sollte in dieser Arbeit die Wirkung von Active Blue 25 auf den BK_{Ca}-Kanal untersucht werden, insbesondere vor dem Hintergrund struktureller Ähnlichkeiten zur Substanz GoSlo-SR-5-6, deren Bindungsstelle (S317R, I326 in S6C; L227A im S4/S5-Linker) bereits bekannt ist. Es sollte untersucht werden, ob beide Substanzen eine gemeinsame Bindungsstelle nutzen. Zu diesem Zweck und zur genaueren Charakterisierung der porenbildenden TM-Domäne S6 wurde eine systematische Untersuchung eines definierten Abschnittes der TM-Domäne S6 des BK_{Ca}-Kanals begonnen.

Alle nachfolgend dargestellten Experimente wurden mithilfe der Patch-Clamp-Methode in der Inside-out-Konfiguration unter folgenden Versuchsbedingungen aufgezeichnet: Es wurden extrazellulär (Pipettenlösung) und intrazellulär (Badlösung) 120 mM K⁺, 10 mM HEPES und 10 mM EGTA (kalziumfrei) verwendet. Der pH-Wert betrug 7,4. Das jeweilig benutzte Spannungsprotokoll ist in entsprechenden Abbildungen dargestellt. Liegen veränderte Versuchsbedingungen vor, werden diese explizit genannt.

3.1 Effekt von Rubidium (Rb⁺) als permeierende Ionenspezies

In den initialen Experimenten wurden die den BK_{Ca}-Kanal permeierenden Kaliumionen durch Rubidiumionen ersetzt. Zu Beginn wurde die extrazelluläre Konzentration von 120 mM K⁺ beibehalten und von intrazellulär jeweils 120 mM K⁺ und 120 mM Rb⁺ auf den BK_{Ca}-Kanal appliziert (Abbildung 10, A). Anschließend wurden die Versuchsbedingungen verändert: Die extrazelluläre Pipettenlösung enthielt 120 mM Rb⁺, von intrazellulär wurden erneut jeweils 120 mM K⁺ und 120 mM Rb⁺ appliziert (Abbildung 10, B). Der BK_{Ca}-Kanal wurde durch intrazellulär appliziertes Rubidium aktiviert. Extrazellulär appliziertes Rubidium zeigte keinen aktivierenden Effekt. Allen Versuchsbedingungen war gemein, dass kein Einwärtsstrom des

BK_{Ca}-Kanals nachweisbar war. Dieser wurde auch nicht durch intrazellulär appliziertes Rubidium aktiviert.

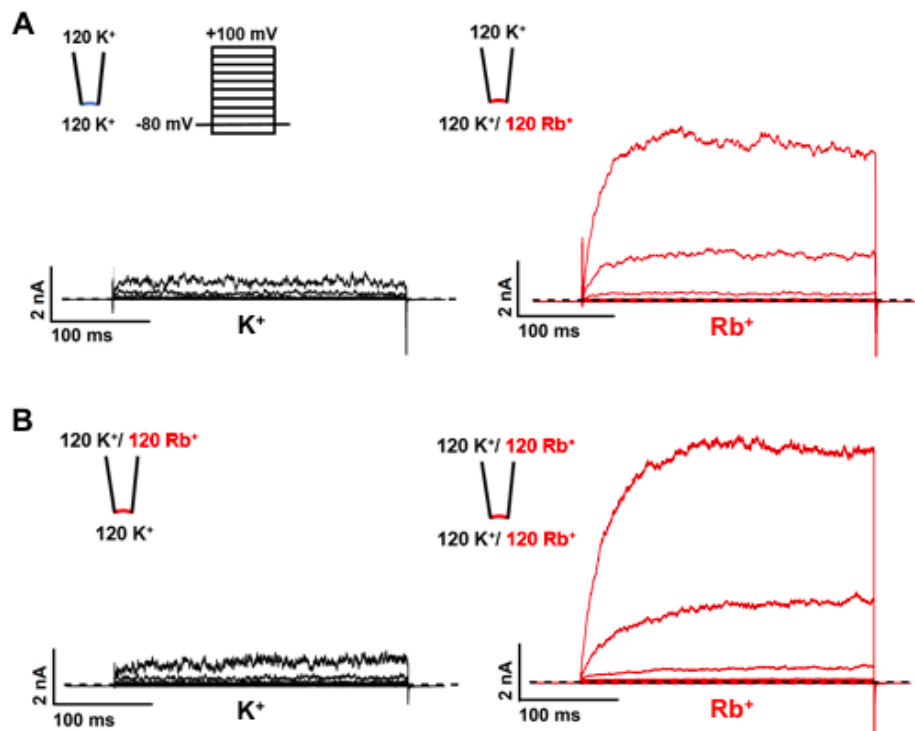


Abbildung 10: Intrazelluläres Rubidium aktiviert den BK_{Ca}-Kanal. (A) BK_{Ca}-Kanalströme, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Spannung von -100 mV bis +100 mV (Zunahme jeweils um 20 mV), extrazellulär 120 mM K⁺, intrazellulär 120 mM K⁺ (schwarze Traces) oder 120 mM Rb⁺ (rote Traces). Intrazelluläres Rb⁺ verursacht einen großen Stromanstieg, der deutlich spannungsabhängig ist. (B) BK_{Ca}-Kanalströme, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Spannung von -100 mV bis +100 mV (Zunahme jeweils um 20 mV), extrazellulär 120 mM Rb⁺, intrazellulär 120 mM K⁺ (schwarze Traces) oder 120 mM Rb⁺ (rote Traces). Intrazellulär appliziertes Rb⁺ verursacht erneut einen großen Stromanstieg, der deutlich spannungsabhängig ist. Extrazellulär appliziertes Rb⁺ zeigt keinen Effekt auf den BK_{Ca}-Kanal.

3.2 Aktivatoren

Im nachfolgenden Kapitel wurde die Wirkung der etablierten BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren NS11021, Active Blue 25 und GoSlo-SR-5-6 untersucht. Außerdem wurde geprüft, ob der hERG-Aktivator NS3623 (Hansen et al., 2006) und der K_{2P}-Aktivator ML67-33 (Bagriantsev et al., 2013), aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu den etablierten BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren, einen aktivierenden Effekt auf den BK_{Ca}-Kanal haben.

3.2.1 Etablierte BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren

3.2.1.1 NS11021

Das Pharmakon NS11021 ist ein synthetisch hergestellter, bereits etablierter, potenter und selektiver BK_{Ca}-Kanal Aktivator (Bentzen et al., 2007). In dieser Arbeit wurden die mittlere

effektive Konzentration (EC_{50}) von NS11021 auf den BK_{Ca} -Kanal und die durchschnittliche Potenzierung der Stromantwort bestimmt. Zur Bestimmung des EC_{50} wurden verschiedene Konzentrationen NS11021 (in 120 mM K^+) auf den BK_{Ca} -Kanal appliziert: 0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M und 100 μ M. Der BK_{Ca} -Kanal zeigte bei einer Konzentration von $27,24 \pm 2,86 \mu$ M einen halbmaximalen Effekt. Der Hill-Koeffizient lag bei $1,36 \pm 0,36$. Bei einer Konzentration von 50 μ M NS11021 wurde der BK_{Ca} -Kanal $13,87 \pm 1,59$ -fach ($n = 9$) aktiviert.

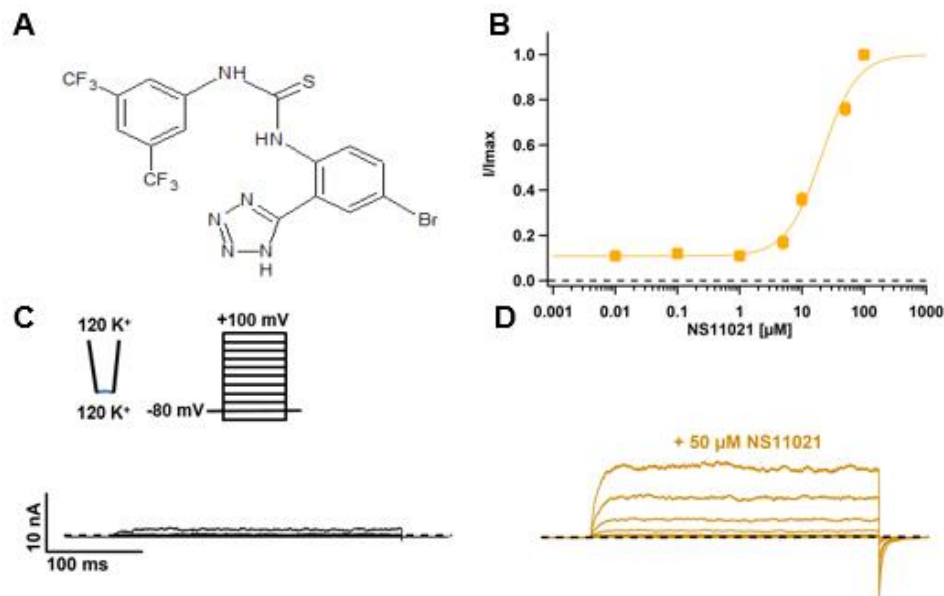


Abbildung 11: Aktivierung des BK_{Ca} -Kanals durch NS11021. (A) Chemische Struktur von NS11021 (B) Dosis-Wirkungs-Kurve, gefittet mit der Hill-Funktion ($EC_{50} = 27,24 \pm 2,86$, $HK = 1,36 \pm 0,36$, $n = 12$). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert und dem dazugehörigen Standardfehler (SEM) bei +100 mV (C) BK_{Ca} -Kanalströme, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4, einer Spannung von -100 mV bis +100 mV (Zunahme jeweils um 20 mV), 0 mM Ca^{2+} und symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K^+ , intrazellulär: 120 mM K^+) (D) BK_{Ca} -Kanalströme vom selben Patch nach Applikation von 50 μ M NS11021 (orangene Traces).

Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen NS11021 statt in 120 mM K^+ in 120 mM Rb^+ gelöst und von intrazellulär auf den BK_{Ca} -Kanal appliziert. Bei einer Konzentration von 50 μ M NS11021 in 120 mM Rb^+ wurde der BK_{Ca} -Kanal nur noch $5,75 \pm 0,47$ -fach ($n = 8$) statt $13,87 \pm 1,59$ -fach in 120 mM K^+ aktiviert (siehe Abbildung 12).

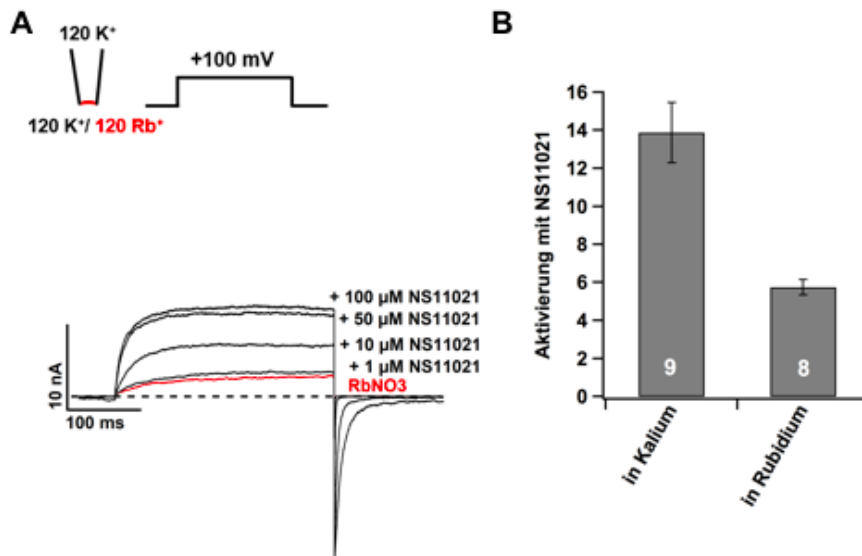


Abbildung 12: Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch NS11021 in Rubidium. (A) BK_{Ca}-Kanalströme, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4, einer Spannung von +100 mV, extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär: 120 mM Rb⁺ (roter Trace), anschließende Applikation von 1 μM, 10 μM, 50 μM, 100 μM NS11021 in 120 mM Rb⁺ (B) Vergleich der Aktivierung von 50 μM NS11021 gelöst in 120 mM K⁺ (durchschnittliche Potenzierung der Stromantwort: 13,87 ± 1,59, n = 9) und 50 μM NS11021 gelöst in 120 mM Rb⁺ (Durchschnittliche Potenzierung der Stromantwort: 5,75 ± 0,47, n = 8).

3.2.1.2 Active Blue 25

Da Active Blue 25 die chemische Grundstruktur des BK_{Ca}-Kanal Aktivators GoSlo-SR-5-6 darstellt (vgl. Abb. 13, A und Abb. 14, A), wurde in dieser Arbeit der Effekt von Active Blue 25 auf den BK_{Ca}-Kanal untersucht. Der vorher angenommene aktivierende Effekt von Active Blue 25 bestätigte sich. Die mittlere effektive aktivierende Konzentration (EC₅₀) lag bei 14,77 ± 2,72 μM und der Hill-Koeffizient bei 2,84 ± 0,76 (n = 7). Eine Konzentration von 50 μM Active Blue 25 führte eine durchschnittliche Aktivierung von 11,58 ± 2,34 herbei (n = 9).

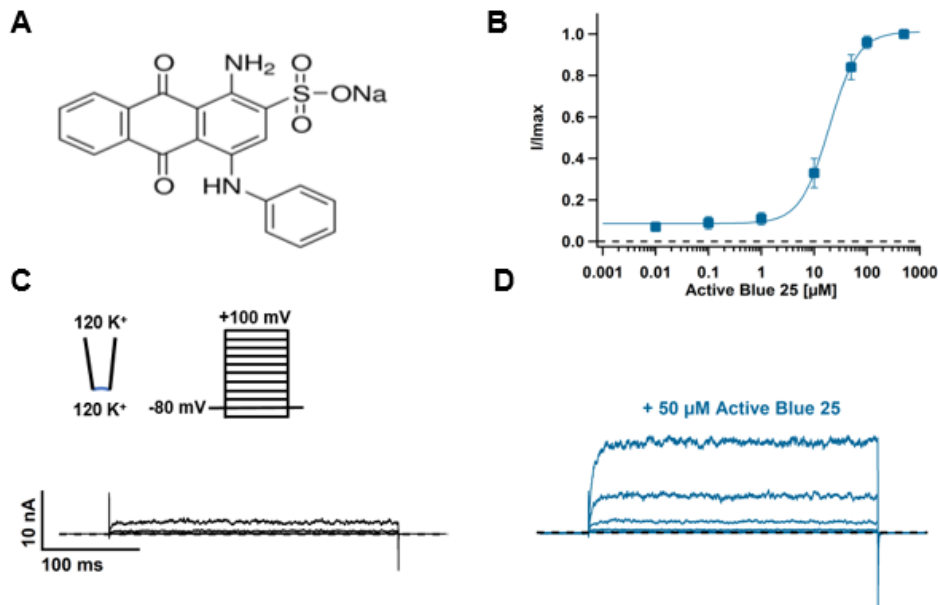


Abbildung 13: Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch Active Blue 25. (A) Chemische Struktur von Active Blue 25 (B) Dosis-Wirkungs-Kurve, gefittet mit der Hill-Gleichung ($EC_{50} = 14,77 \pm 2,72$, $HK = 2,84 \pm 0,76$, $n = 7$). Jeder Datenpunkt entspricht dem Durchschnittswert \pm SEM (C) BK_{Ca}-Kanalströme, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4, einer Spannung von -100 mV bis +100 mV (Zunahme jeweils um 20 mV) und symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär: 120 mM K⁺) (D) BK_{Ca}-Kanalströme vom selben Patch nach Applikation von 50 μ M Active Blue 25 (blaue Traces).

3.2.1.3 GoSlo-SR-5-6

GoSlo-SR-5-6 ist ein bereits in der Literatur beschriebener BK_{Ca}-Kanal Agonist, welcher den BK_{Ca}-Kanal sehr potent aktiviert. In dieser Arbeit wurde der BK_{Ca}-Kanal im Durchschnitt 10,33 \pm 1,2-fach ($n = 7$) von 10 μ M GoSlo-SR-5-6 aktiviert.

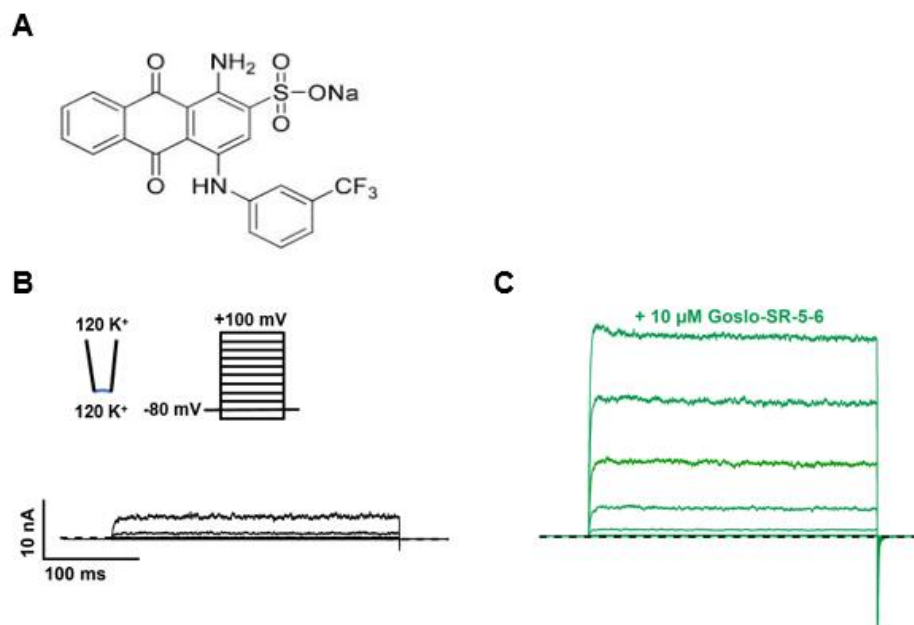


Abbildung 14: Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch GoSlo-SR-5-6. (A) Chemische Struktur von GoSlo-SR-5-6 (B) BK_{Ca}-Kanalströme, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Spannung von -100 mV bis +100 mV (Zunahme jeweils um 20 mV), 0 mM Ca²⁺ und symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär: 120 mM K⁺) (C) BK_{Ca}-Kanalströme vom selben Patch nach Applikation von 10 μM GoSlo-SR-5-6 (grüne Traces).

3.2.2 Nicht-etablierte BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren

3.2.2.1 hERG-Kanal Aktivator NS3623

Das Pharmakon NS3623 ist ein etablierter Aktivator des hERG-Kanals (Hansen et al., 2006). In dieser Arbeit wurde der Effekt des hERG-Aktivators am BK_{Ca}-Kanal untersucht. Eine Konzentration von 50 μM NS3623 führte zu einer durchschnittlichen Potenzierung der Stromantwort um $7,29 \pm 0,64$ (n = 7).

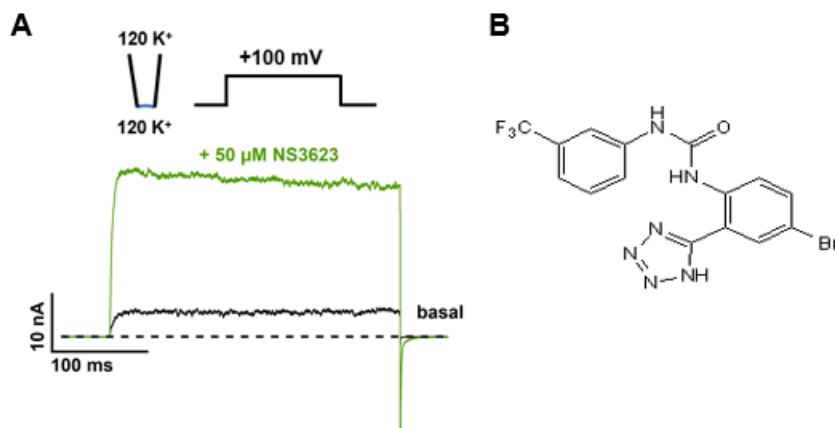


Abbildung 15: Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch NS3623. (A) BK_{Ca}-Kanalströme, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4, einer Spannung von +100 mV, 0 mM Ca²⁺ und symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär: 120 mM K⁺). Grüner Trace: BK_{Ca}-Kanalstrom vom selben Patch nach Applikation von 50 μM NS3623 (B) Chemische Struktur von NS3623.

3.2.2.2 K_{2P}-Kanal Aktivator ML67-33

Das Pharmakon ML67-33 ist ein selektiver Aktivator von temperatur- und mechanosensitiven Zwei-Porendomänen-Kaliumkanälen (Bagriantsev et al., 2013). Der BK_{Ca}-Kanal wurde von 50 μM ML67-33 $11,87 \pm 2,36$ -fach aktiviert (n = 9).

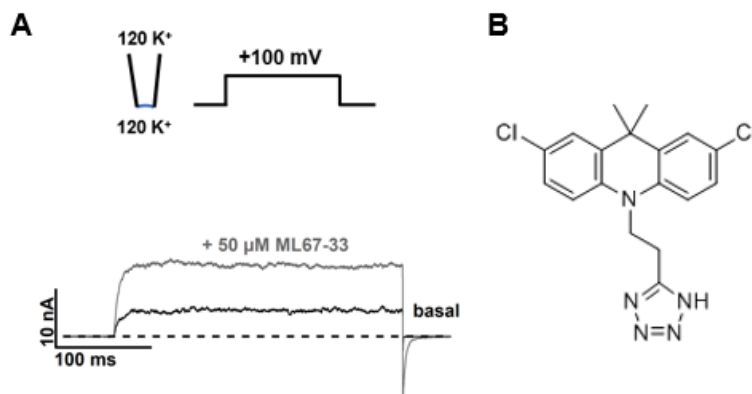


Abbildung 16: Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch ML67-33. (A) BK_{Ca}-Kanalströme, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4, einer Spannung von +100 mV, 0 mM Ca²⁺ und symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär: 120 mM K⁺). Grauer Trace: BK_{Ca}-Kanal Strom vom selben Patch nach Applikation von 50 μM ML67-33 (B) Chemische Struktur von ML67-33.

3.3 Inhibitoren des BK_{Ca}-Kanals

In den folgenden Experimenten wurde der inhibierende Effekt der quartären Ammoniumionen Tetrapentylammonium, Tetrahexylammonium und Tetraheptylammonium auf den BK_{Ca}-Kanal untersucht.

3.3.1 Quartäre Ammoniumverbindungen

3.3.1.1 Tetrapentylammonium

Verschiedene Konzentrationen (0,1 μM bis 1 mM) der quartären Ammoniumverbindung Tetrapentylammonium wurden von intrazellulär auf den BK_{Ca}-Kanal appliziert. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) von Tetrapentylammonium lag bei 5,21 ± 2,27 μM und der Hill-Koeffizient bei 1,15 ± 0,25 (n = 10).

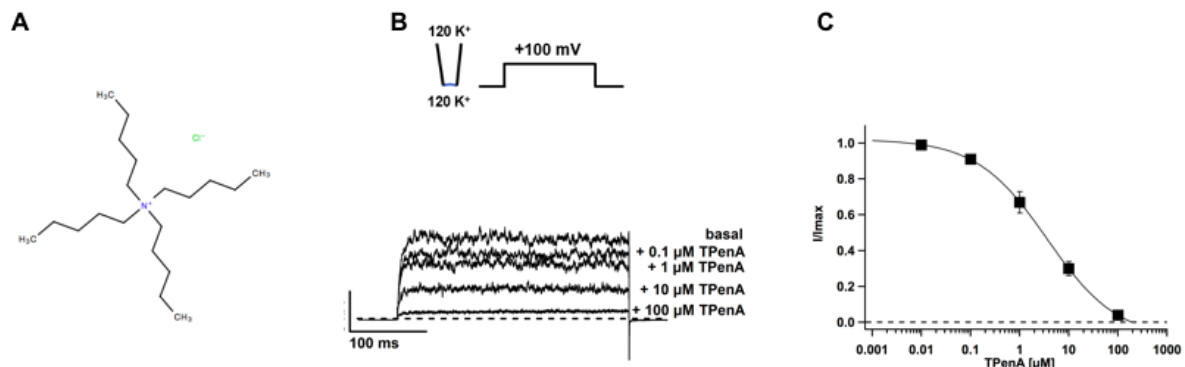


Abbildung 17: Inhibition des BK_{Ca}-Kanals durch Tetrapentylammonium. (A) Chemische Struktur von Tetrapentylammonium (ChemicalBook, 2017) (B) BK_{Ca}-Kanalströme, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4, einer Spannung von +100 mV und symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär: 120 mM K⁺), Applikation von unterschiedlichen Konzentrationen TPenA (0,1 μM, 1 μM, 10 μM, 100 μM) (C) Dosis-Wirkungs-Kurve, gefittet mit der Hill-Funktion (IC₅₀ = 5,21 ± 2,27, HK = 1,15 ± 0,25, n = 10). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert ± SEM.

3.3.1.2 Tetrahexylammonium

Tetrahexylammonium inhibierte den BK_{Ca}-Kanal deutlich potenter als Tetrapentylammonium mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) von 0,28 ± 0,06 μM und einem Hill-Koeffizienten von 1,54 ± 0,06 (n = 9).

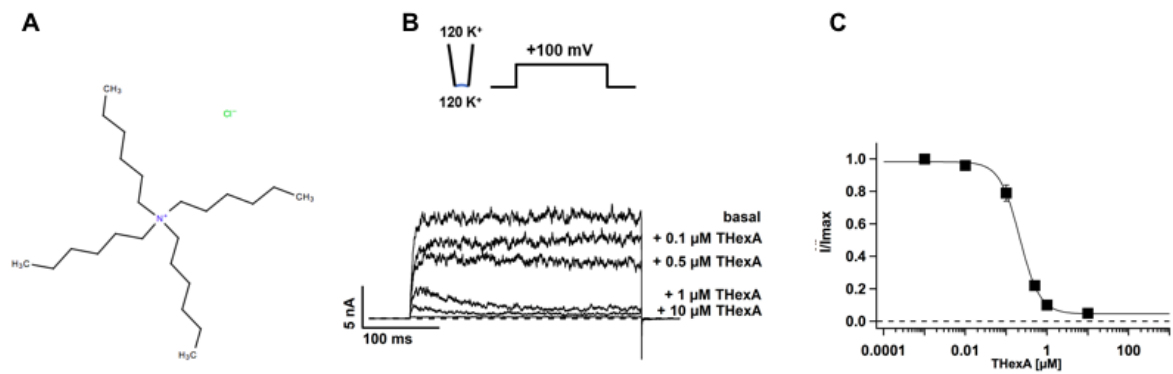


Abbildung 18: Inhibition des BK_{Ca}-Kanals durch Tetrahexylammonium. (A) Chemische Struktur von Tetrahexylammonium (ChemicalBook, 2017) (B) BK_{Ca}-Kanalströme, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4, einer Spannung von +100 mV und symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär: 120 mM K⁺), Applikation von verschiedenen Konzentrationen THexA (0,1 μM, 0,5 μM, 1 μM, 10 μM) (C) Dosis-Wirkungs-Kurve, gefittet mit der Hill-Gleichung (IC₅₀ = 0,28 ± 0,06, HK = 1,54 ± 0,06, n = 9). Jeder Datenpunkt gibt den berechneten Mittelwert ± SEM wieder.

3.3.1.3 Tetraheptylammonium

Tetraheptylammonium inhibierte den BK_{Ca}-Kanal mit einer mittleren Konzentration (IC₅₀) von 4,48 ± 1,9 μM (n = 5) und glich somit in seinem antagonistischen Effekt auf den BK_{Ca}-Kanal dem von Tetrapentylammonium.

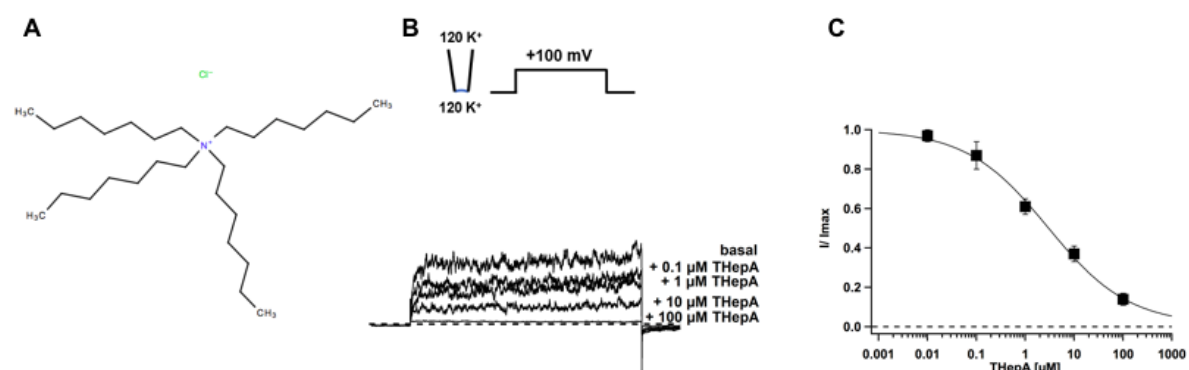


Abbildung 19: Inhibition des BK_{Ca}-Kanals durch Tetraheptylammonium. (A) Chemische Struktur von Tetraheptylammonium (ChemicalBook, 2017) (B) BK_{Ca}-Kanalströme, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4, einer Spannung von +100 mV und symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär: 120 mM K⁺), Applikation von verschiedenen Konzentrationen THepA (0,1 μM, 1 μM, 10 μM, 100 μM) (C) Dosis-Wirkungs-Kurve, gefittet mit der Hill-Gleichung (IC₅₀ = 4,48 ± 1,9, n = 5). Jeder Datenpunkt gibt den berechneten Mittelwert ± SEM wieder.

3.4 QA⁺-Kompetitionsversuche mit BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren

Die Bindungsstelle der untersuchten quartären Ammoniumverbindungen ist bekannt und liegt unmittelbar unterhalb des inneren Eingangs zum Selektivitätsfilter. In den folgenden Experimenten wurde eine mögliche Konkurrenz der sehr potent auf den BK_{Ca}-Kanal

wirkenden quartären Ammoniumverbindung Tetrahexylammonium mit den negativ geladenen Aktivatoren NS11021, NS3623, PD-118057, ML67-33 und Active Blue 25 untersucht.

3.4.1 QA⁺-Kompetitionsversuch mit NS11021

Es sollte eine mögliche überlappende Bindungsstelle von Tetrahexylammonium und NS11021 untersucht werden. Hierzu wurde der BK_{Ca}-Kanal zunächst mit 50 µM NS11021 aktiviert. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM) THexA in einer Stammlösung von 50 µM NS11021 gelöst und von intrazellulär auf den BK_{Ca}-Kanal appliziert. Die extrazelluläre Lösung blieb mit 120 mM K⁺ unverändert. Die Dosis-Wirkungs-Kurve der Inhibition durch Tetrahexylammonium gelöst in 50 µM NS11021 zeigt eine eindeutige Rechtsverschiebung im Vergleich zur klassischen BK_{Ca}-Kanal Inhibition durch Tetrahexylammonium. Die mittlere inhibitorische Konzentration stieg von $0,28 \pm 0,06$ µM (THexA) auf $11,14 \pm 2,72$ µM (THexA in 50 µM NS11021, n = 9). Die Daten implizieren eine Konkurrenz des BK_{Ca}-Kanal Aktivators NS11021 und des Inhibitors Tetrahexylammonium um eine gemeinsam genutzte Bindungsstelle.

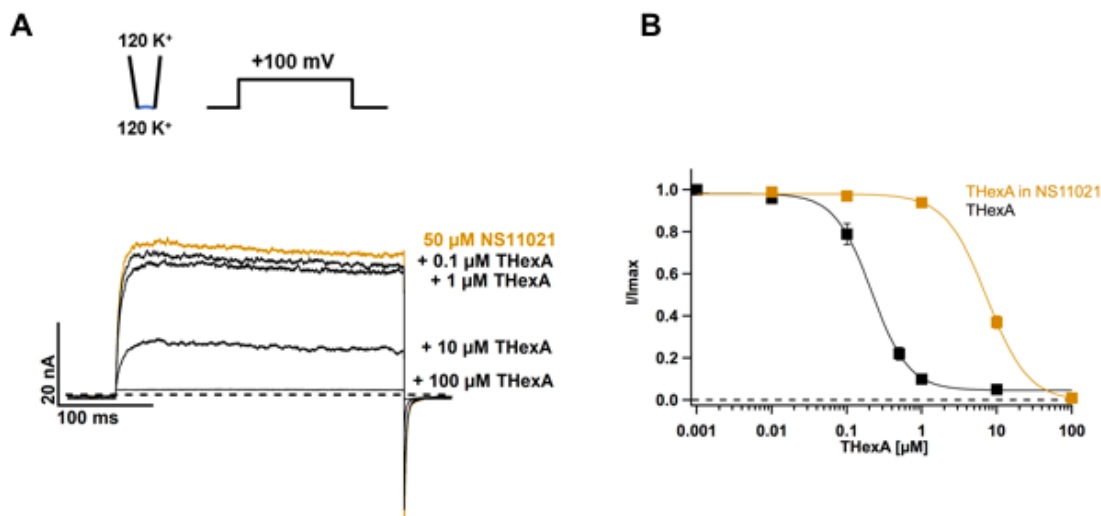


Abbildung 20: QA⁺-Kompetitionsversuch mit NS11021. (A) BK_{Ca}-Kanalströme, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4, einer Spannung von +100 mV und symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär: 120 mM K⁺), orangener Trace: vorangegangene Aktivierung mit 50 µM NS11021, Applikation von verschiedenen Konzentrationen THexA (0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM), gelöst in 50 µM NS11021 (B) schwarze Dosis-Wirkungs-Kurve: Inhibition des BK_{Ca}-Kanals durch THexA, gefittet mit der Hill-Gleichung ($IC_{50} = 0,28 \pm 0,06$, $HK = 1,54 \pm 0,06$, n = 9). Orangene Dosis-Wirkungs-Kurve: Inhibition des BK_{Ca}-Kanals durch THexA in 50 µM NS11021, gefittet mit der Hill-Gleichung ($IC_{50} = 11,14 \pm 2,72$, $HK = 1,3 \pm 0,29$, n = 9). Jeder Datenpunkt entspricht dem Durchschnittswert \pm SEM.

3.4.2 QA⁺-Kompetitionsversuch mit NS3623

Des Weiteren wurde eine mögliche Konkurrenz von Tetrahexylammonium und dem hERG-Aktivator NS3623 untersucht. Der BK_{Ca}-Kanal wurde zunächst mit 50 µM NS3623 aktiviert. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen Tetrahexylammonium in 50 µM NS3623 gelöst und von intrazellulär auf den BK_{Ca}-Kanal appliziert. Die mittlere inhibitorische Konzentration verschob sich von $0,28 \pm 0,06 \mu\text{M}$ (THexA) auf $5,74 \pm 0,98 \mu\text{M}$ (THexA in 50 µM NS3623, n = 9).

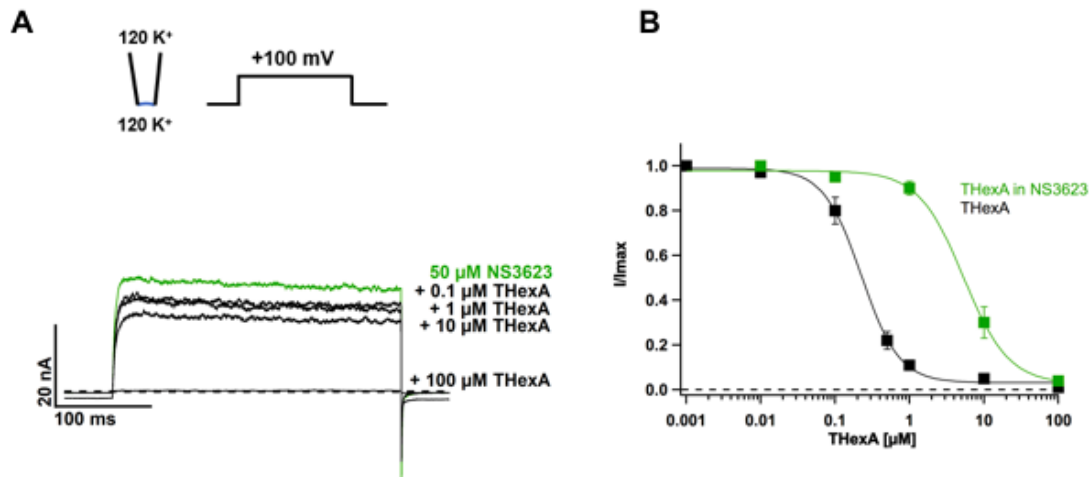


Abbildung 21: QA⁺-Kompetitionsversuch mit NS3623. (A) BK_{Ca}-Kanalströme, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4, einer Spannung von +100 mV und symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär: 120 mM K⁺), grüner Trace: vorangegangene Aktivierung mit 50 µM NS3623, Applikation von verschiedenen Konzentrationen THexA (0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM), gelöst in 50 µM NS3623 (B) Schwarze Dosis-Wirkungs-Kurve: Inhibition des BK_{Ca}- Kanals durch THexA, gefittet mit der Hill-Gleichung ($IC_{50} = 0,28 \pm 0,06$, $HK = 1,54 \pm 0,06$, n = 9). Grüne Dosis-Wirkungs-Kurve: Inhibition des BK_{Ca}-Kanals durch ThexA in 50 µM NS3623, gefittet mit der Hill-Gleichung ($IC_{50} = 5,738 \pm 0,98$, $HK = 1,24 \pm 0,15$, n = 7). Jeder Datenpunkt entspricht dem Durchschnittswert \pm SEM.

3.4.3 QA⁺-Kompetitionsversuch mit PD-118057

Im nachfolgenden Experiment wurden verschiedene Konzentrationen Tetrahexylammonium in 20 µM des etablierten hERG-Aktivators PD-118057 (J. Zhou et al., 2005) gelöst und von intrazellulär auf den BK_{Ca}- Kanal appliziert. Die vorangegangene Aktivierung durch 20 µM PD-118057 ist mit einer Potenzierung der Stromantwort um das $2,58 \pm 0,44$ - fache (n = 5) vergleichsweise gering ausgefallen. Die mittlere inhibitorische Konzentrationen verschob sich von $0,28 \pm 0,06 \mu\text{M}$ (THexA) auf $0,83 \pm 0,14 \mu\text{M}$ (THexA in 20 µM PD-118057, n = 5).

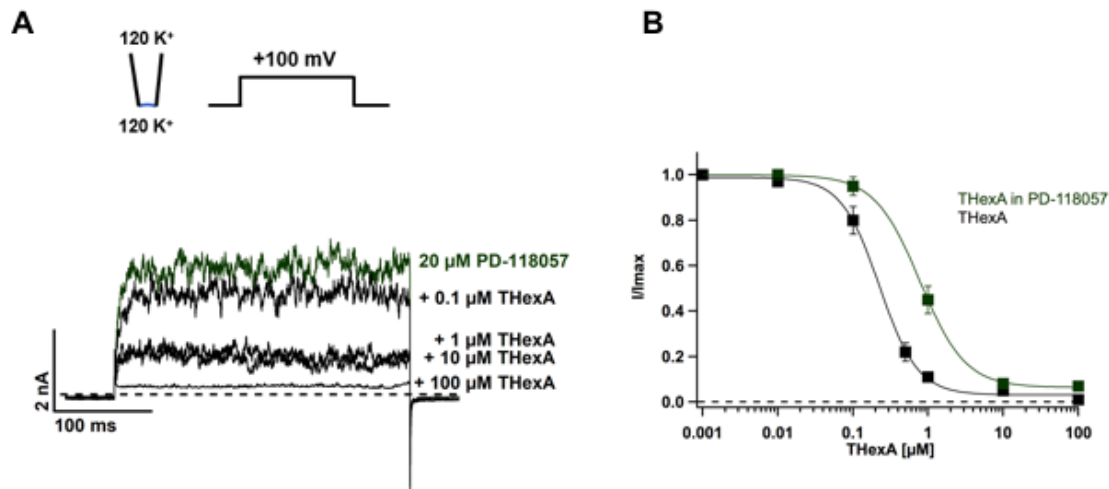


Abbildung 22: QA⁺-Kompetitionsversuch mit PD-118057. (A) BK_{Ca}-Kanalströme, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4, einer Spannung von +100 mV und symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär: 120 mM K⁺), dunkelgrüner Trace: vorangegangene Aktivierung mit 20 μM PD-118057, Applikation von verschiedenen Konzentrationen THexA (0,1 μM, 1 μM, 10 μM, 100 μM), gelöst in 20 μM PD-118057 (B) Schwarze Dosis-Wirkungs-Kurve: Inhibition des BK_{Ca}-Kanals durch THexA, gefittet mit der Hill-Gleichung (IC₅₀ = 0,28 ± 0,06, HK = 1,54 ± 0,06, n = 9). Dunkelgrüne Dosis-Wirkungs-Kurve: Inhibition des BK_{Ca}-Kanals durch THexA in 20 μM PD-118057, gefittet mit der Hill-Gleichung (IC₅₀ = 0,83 ± 0,14, HK = 1,36 ± 0,17, n = 5). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert ± SEM.

3.4.4 QA⁺-Kompetitionsversuch mit ML67-33

Ergänzend wurde eine mögliche Konkurrenz von THexA mit dem K_{2P}-Aktivator ML67-33 untersucht. Hierzu wurden die verschiedenen Konzentrationen Tetrahexylammonium in einer Stammlösung von 50 μM ML67-33 gelöst und von intrazellulär auf den BK_{Ca}-Kanal appliziert. Der IC₅₀-Wert verschob sich von 0,28 ± 0,06 μM (THexA) auf 4 ± 0,28 μM (THexA in 50 μM ML67-33, n = 5).

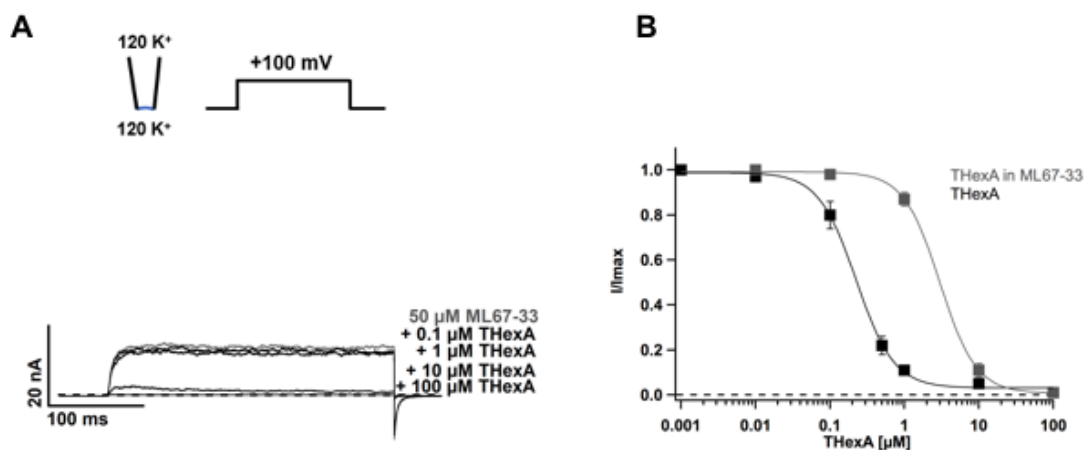


Abbildung 23: QA⁺-Kompetitionsversuch mit ML67-33. (A) BK_{Ca}-Kanalströme, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4, einer Spannung von +100 mV und symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär: 120 mM K⁺), grauer Trace: vorangegangene Aktivierung mit 50 μM ML67-33,

Applikation von verschiedenen Konzentrationen THexA (0.1 μM , 1 μM , 10 μM , 100 μM), gelöst in 50 μM ML67-33 **(B)** Schwarze Dosis-Wirkungs-Kurve: Inhibition des BK_{Ca}- Kanals durch THexA, gefittet mit der Hill-Gleichung ($\text{IC}_{50} = 0,28 \pm 0,06$, $\text{HK} = 1,54 \pm 0,06$, $n = 9$). Graue Dosis-Wirkungs-Kurve: Inhibition des BK_{Ca}-Kanals durch ThexA in 50 μM ML67-33, gefittet mit der Hill-Gleichung ($\text{IC}_{50} = 4 \pm 0,28$, $\text{HK} = 1,7 \pm 0,12$, $n = 5$). Jeder Datenpunkt gibt den berechneten Mittelwert \pm SEM wieder.

3.4.5 QA⁺-Kompetitionsversuch mit Active Blue 25

Dasselbe Experiment wurde mit Tetrahexylammonium und Active Blue 25 wiederholt. Hierzu wurden die Konzentrationen 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM und 10 μM THexA in 50 μM Active Blue 25 gelöst und von intrazellulär auf den BK_{Ca}-Kanal appliziert. Active Blue 25 hatte im Vergleich zu den anderen Aktivatoren einen geringeren Effekt auf den IC_{50} -Wert. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) veränderte sich nur geringfügig von $0,28 \pm 0,06 \mu\text{M}$ (THexA) auf $0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (THexA in 50 μM Active Blue 25, $n = 7$).

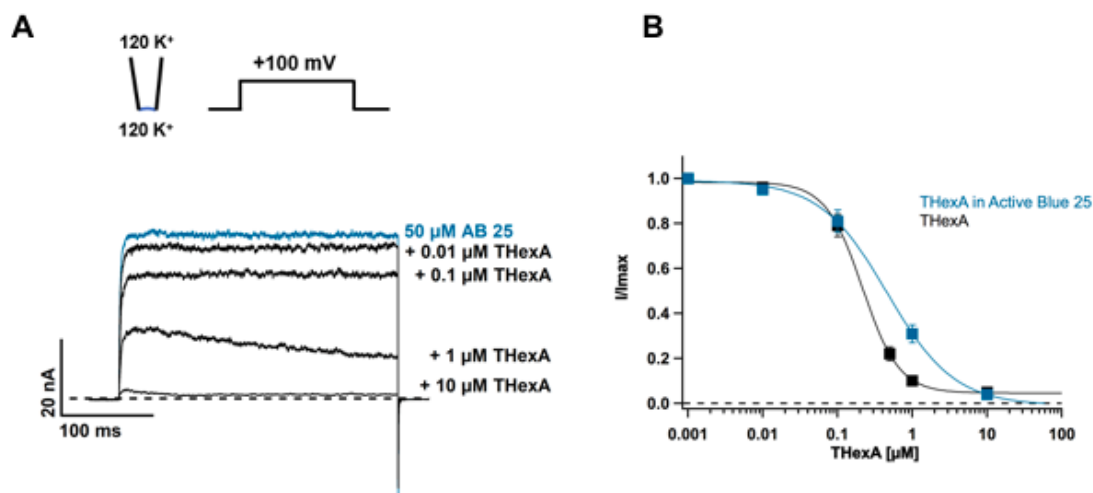


Abbildung 24: QA⁺-Kompetitionsversuch mit Active Blue 25. (A) BK_{Ca}-Kanalströme, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4, einer Spannung von +100 mV und symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär: 120 mM K⁺), blauer Trace: vorangegangene Aktivierung mit 50 μM Active Blue 25, Applikation von verschiedenen Konzentrationen THexA (0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 10 μM), gelöst in 50 μM Active Blue 25 **(B)** Schwarze Dosis-Wirkungs-Kurve: Inhibition des BK_{Ca}-Kanals durch THexA, gefittet mit der Hill-Gleichung ($\text{IC}_{50} = 0,28 \pm 0,06$, $\text{HK} = 1,54 \pm 0,06$, $n = 9$). Blaue Dosis-Wirkungs-Kurve: Inhibition des BK_{Ca}-Kanals durch ThexA in 50 μM Active Blue 25, gefittet mit der Hill-Gleichung ($\text{IC}_{50} = 0,4 \pm 0,1$, $\text{HK} = 1,26 \pm 0,04$, $n = 7$). Jeder Datenpunkt entspricht dem Durchschnittswert \pm SEM.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die apparente Affinität von Tetrahexylammonium in Gegenwart der Aktivatoren NS11021, NS3623, PD-118057 und ML67-33 deutlich verringert war. Eine Konkurrenz zwischen Tetrahexylammonium und den untersuchten Aktivatoren legt nahe, dass es eine Überlappung in der Bindungsstelle geben kann. Der Aktivator Active Blue 25 zeigte im Vergleich zu den anderen untersuchten Aktivatoren einen geringeren Effekt auf die mittlere inhibitorische Konzentration, sodass hier aufgrund der fehlenden Konkurrenz zwischen Tetrahexylammonium und Active Blue 25 nicht von einer überlappenden

Bindungsstelle ausgegangen werden kann. In Abbildung 25 wurden die IC_{50} -Werte von Tetrahexylammonium in 120 mM K^+ mit den IC_{50} -Werten von Tetrahexylammonium, gelöst in den unterschiedlichen Aktivatoren, verglichen und dargestellt.

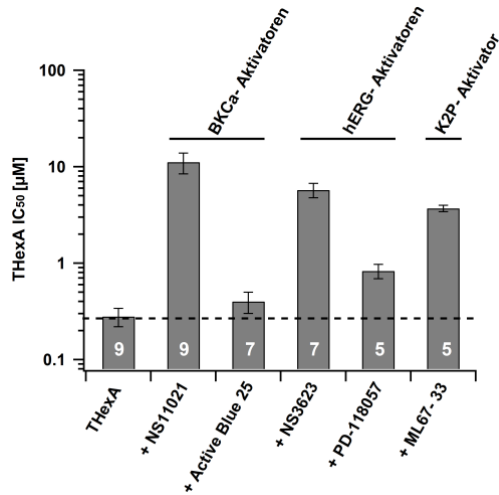


Abbildung 25: Vergleich der IC_{50} -Werte der QA^+ -Kompetitionsversuche. Die Balken repräsentieren den IC_{50} -Wert \pm SEM der Tetrahexylammonium-Inhibition. Links im Balkendiagramm findet sich der IC_{50} -Wert von THexA in K^+ ($IC_{50} = 0,28 \pm 0,06$), verdeutlicht durch eine gestrichelte Linie. Die weiteren Balken stellen die IC_{50} -Werte von THexA in 50 μ M NS11021, in 50 μ M Active Blue, in 50 μ M NS3623, in 20 μ M PD-118057 und in 50 μ M ML67-33 dar. Im jeweiligen Balken findet sich in weißer Schrift die jeweilige Anzahl der Experimente (n).

3.5 Systematische Untersuchung der porenformenden TM-Domäne S6

Im folgenden Kapitelabschnitt erfolgte eine systematische Untersuchung eines definierten Abschnittes der Transmembran-Domäne S6 des BK_{Ca}-Kanals. Abbildung 26 zeigt ein Topologiemodell sowie einen Sequenzabschnitt des BK_{Ca}-Kanals, in denen die Lokalisation der in den nachfolgenden Experimenten untersuchten Aminosäuren A316, S317 und Y318 vereinfacht dargestellt ist.

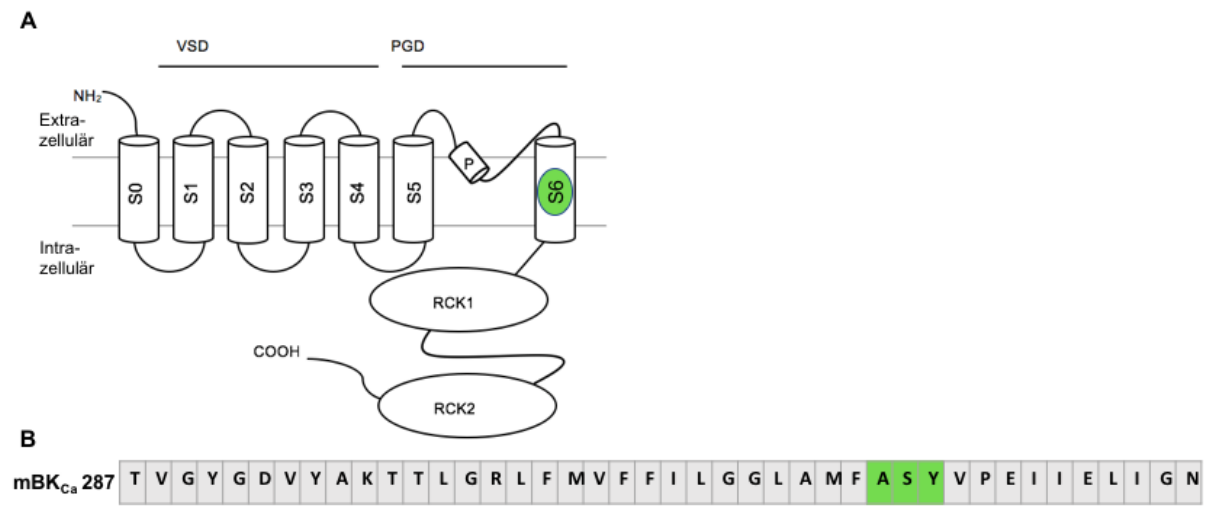


Abbildung 26: Topologiemodell und Sequenzabschnitt des BK_{Ca}-Kanals. (A) Membrantopologie einer α -Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals, dargestellt sind die sieben TM-Domänen S0-S6. S1-S4 bilden die spannungsvermittelnde Domäne. S5, P und S6 bilden die Poren-Domäne; RCK1 und RCK2 bilden die zytosolische Domäne. In der TM-Domäne S6 (grün markiert) sind die in den nachfolgenden Experimenten untersuchten Aminosäuren A316, S317 und Y318 lokalisiert. (B) Sequenzabschnitt des mBK_{Ca}-Kanals (GenBank-Nummer: NM_001253378.1). Der Selektivitätsfilter ist durch eine braune Linie markiert. Die untersuchten Aminosäuren A316, S317 und Y318 der TM-Domäne S6 sind grün hervorgehoben.

3.5.1 Effekt von Mutante A316E

An der Lokalisation A316 des S6-Segmentes sorgte ein Austausch der hydrophoben, ungeladenen Aminosäure Alanin (A) durch das hydrophile, negativ geladene Glutamat (E) für einen konstitutiv geöffneten BK_{Ca}-Kanal. Im Kontrast zum BK_{Ca}-Kanal Wildtyp (WT) befand sich die Mutante A316E bereits bei einer Spannung von -80 mV, symmetrisch Kalium und 0 mM Ca²⁺ im geöffneten Zustand. Der BK_{Ca}-Kanal WT ist bei -80 mV hingegen geschlossen und öffnet spannungsabhängig. Abbildung 27 zeigt die vergleichenden Stromantworten im Grundzustand des BK_{Ca}-Kanal Wildtyps und der Mutante A316E.

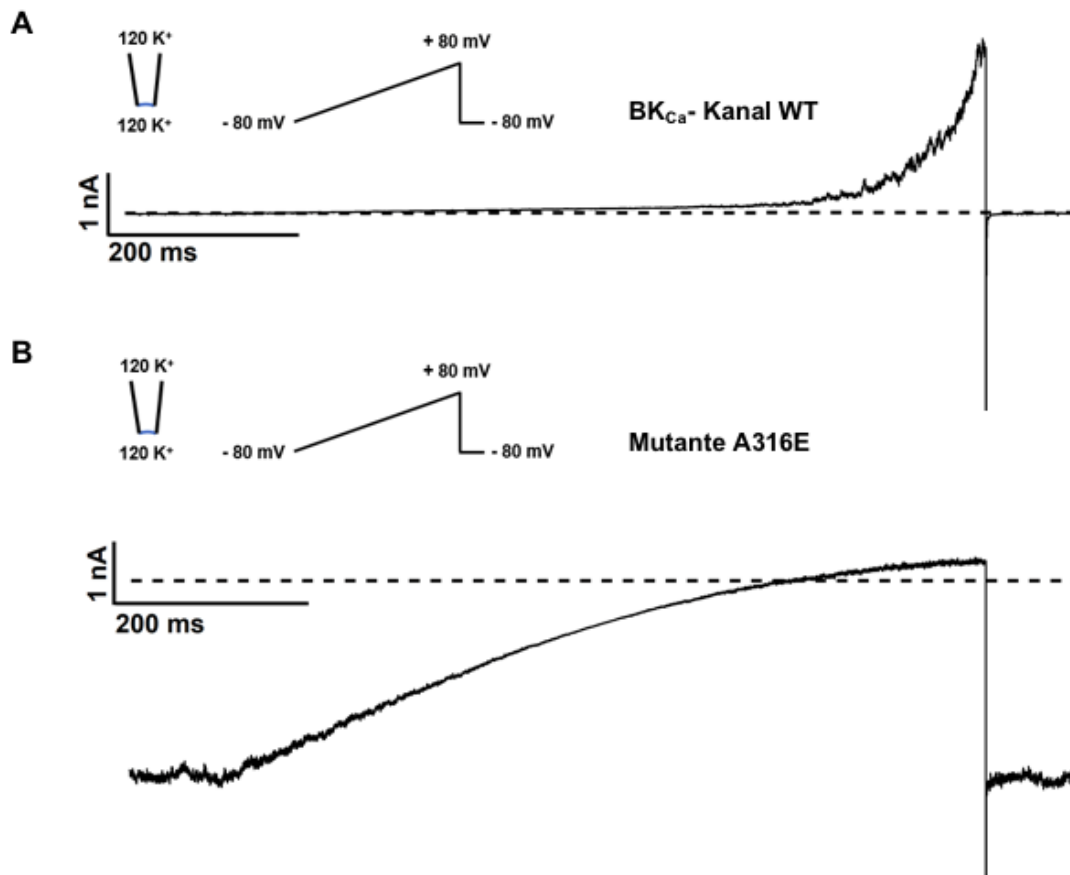


Abbildung 27: Vergleich der Stromantworten im Grundzustand des BK_{Ca}-Kanal Wildtyps und der Mutante A316E. (A) BK_{Ca}-Kanal WT (B) Mutante A316E des BK_{Ca}-Kanals, beide Kanäle wurden jeweils On Cell aufgezeichnet, beginnend bei einer Spannung von -80 mV, die allmählich auf +80 mV depolarisierte und dann wieder auf -80 mV hyperpolarisiert wurde. Der pH-Wert lag bei 7,4, symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär 120 mM K⁺) und 0 mM Ca²⁺.

Intrazelluläres Rubidium inhibiert den Auswärtsstrom der Mutante A316E des BK_{Ca}-Kanals

Der BK_{Ca}-Kanal Wildtyp lässt sich durch intrazellulär appliziertes Rubidium aktivieren, wobei Rubidium die spannungsabhängige Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals potenziert (vgl. Abbildung 28, B). Im folgenden Experiment wurde der Effekt von intrazellulär appliziertem Rubidium auf die Mutante A316E untersucht. Die extrazelluläre Bedingung von 120 mM K⁺ wurde belassen und von intrazellulär jeweils 120 mM K⁺ und 120 mM Rb⁺ auf die Mutante A316E des BK_{Ca}-Kanals appliziert. Die Mutante A316E zeigt im Gegensatz zum BK_{Ca}-Kanal WT keine spannungsabhängige Aktivierung durch intrazelluläres Rubidium. Der Auswärtsstrom der Mutante A316E des BK_{Ca}-Kanals wird durch intrazelluläres Rubidium blockiert (Abbildung 28, A und C). Die Mutante A316E des BK_{Ca}-Kanals ist bereits bei Spannungen von -100 mV geöffnet, unabhängig davon, ob Kalium oder Rubidium das permeierende Ion ist.

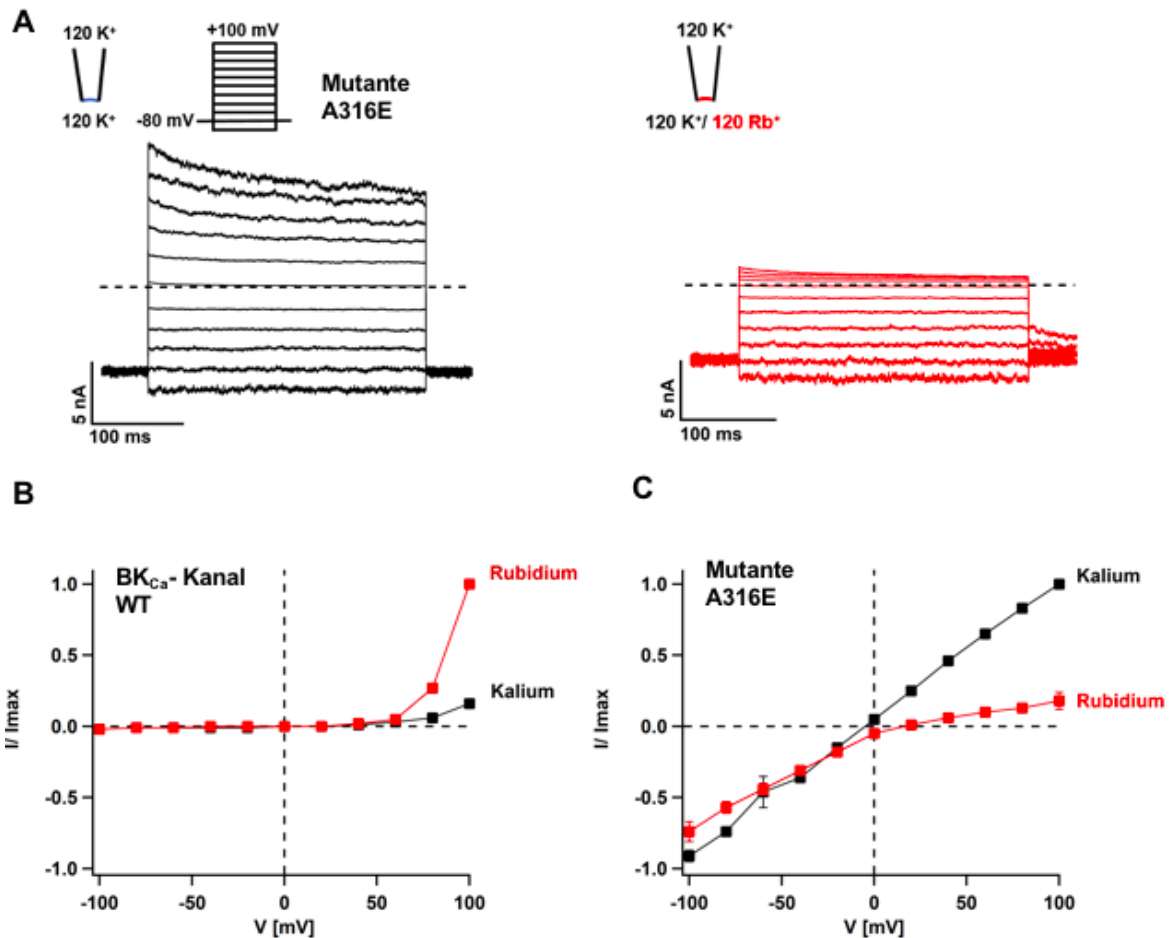


Abbildung 28: Intrazelluläres Rubidium inhibiert den Auswärtsstrom in der Mutante A316E des BK_{Ca}-Kanals. (A) Repräsentative Ströme, gemessen bei einem pH- Wert von 7,4 und einer Spannung von -100 mV bis +100 mV (Zunahme jeweils um 20 mV), extrazellulär 120 mM K⁺, intrazellulär 120 mM K⁺ (schwarze Traces) oder 120 mM Rb⁺ (rote Traces) (B) Strom-Spannungs-Beziehung des BK_{Ca}-Kanals WT nach Applikation von Kalium (schwarz) und Rubidium (rot), dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SEM der normierten Ströme (n = 5), (C) Strom-Spannungs-Beziehung der Mutante A316E nach Applikation von Kalium (schwarz) und Rubidium (rot), dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der normierten Ströme (n = 10).

Die Aktivierung der Mutante A316E des BK_{Ca}-Kanals durch Active Blue 25 war im Gegensatz zum BK_{Ca}-Kanal Wildtyp deutlich vermindert (siehe Abbildung 29). Die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) lag bei einer Spannung von +100 mV bei $27,29 \pm 3,56$ und der Hill-Koeffizient bei $6,05 \pm 2,7$ (n = 14).

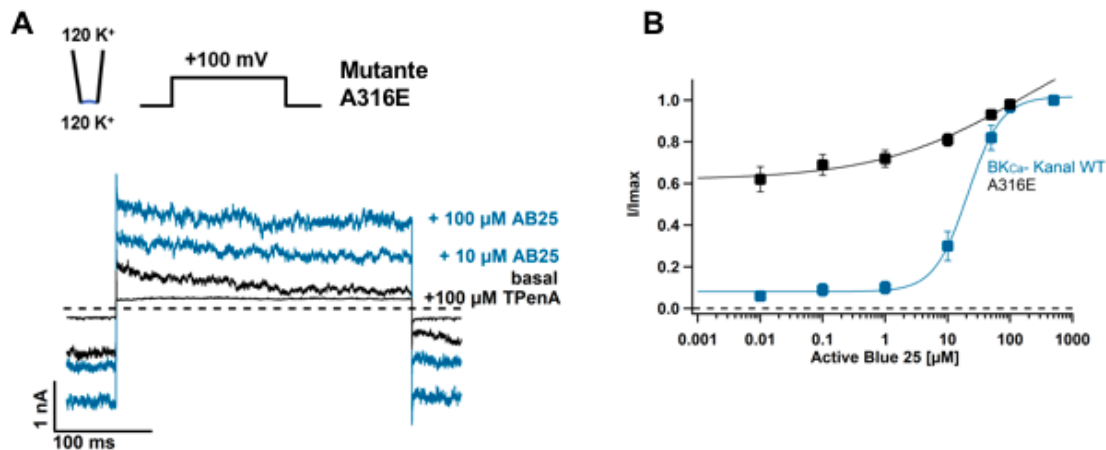


Abbildung 29: Verminderter Effekt von Active Blue 25 auf die Mutante A316E des BK_{Ca}-Kanals. (A) Ströme der Mutante A316E des BK_{Ca}-Kanals, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4, einer Spannung von +100 mV und symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär: 120 mM K⁺), Applikation von 10 und 100 μM Active Blue 25 (blaue Graphen) und von 100 μM TPenA (B) Blaue Dosis-Wirkungs-Kurve: Aktivierung des BK_{Ca}-Kanal Wildtyps durch Active Blue 25, gefittet mit der Hill-Gleichung (EC₅₀ = 14,77 ± 2,72, HK = 2,84 ± 0,76, n = 11). Schwarze Dosis-Wirkungs-Kurve: Aktivierung der Mutante A316E des BK_{Ca}-Kanals durch Active Blue 25, gefittet mit der Hill-Gleichung (EC₅₀ = 27,29 ± 3,56, HK = 6,05 ± 2,7, n = 14). Jeder Datenpunkt entspricht dem Durchschnittswert ± SEM.

3.5.2 Effekt von Mutante S317R

Die Aminosäure S317 befindet sich ebenfalls in der TM-Domäne S6 der α-Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals und wurde bereits in Kapitel 1.2.4.1 als eine der bereits identifizierten, an der Bindung des Pharmakons GoSlo-SR-5-6 beteiligten Aminosäuren beschrieben. In den folgenden Experimenten wurde der Effekt von GoSlo-SR-5-6, seiner chemischen Leitstruktur Active Blue 25 und von NS11021 auf die Mutante S317R untersucht und verglichen (siehe Abbildung 30). Die Mutante S317R zeigte im Vergleich zum BK_{Ca}-Kanal Wildtyp eine deutlich verminderte Aktivierung durch GoSlo-SR-5-6 und Active Blue 25. Der BK_{Ca}-Kanal Wildtyp wurde durch 50 μM Active Blue 25 11,59 ± 2,34-fach (n = 9) aktiviert, die Mutante S317R hingegen nur noch 2,7 ± 0,29-fach (n = 6). Auch 100 μM Active Blue 25 verursachten nur noch eine 2,91 ± 0,29-fache Aktivierung der Mutante S317R. Der BK_{Ca}-Kanal WT ließ sich noch 16,87 ± 5,31-fach durch 100 μM Active Blue 25 aktivieren. Die durchschnittliche Aktivierung durch 10 μM GoSlo-SR-5-6 verminderte sich von 10,33 ± 1,2 (n = 7) beim BK_{Ca}-Kanal WT auf 3,08 ± 0,04 (n = 10) bei der Mutante S317R. Die Aktivierung durch NS11021 blieb bei der Mutante S317R nahezu unverändert im Vergleich zum BK_{Ca}-Kanal WT. Die durch NS11021

verursachte Potenzierung der Stromantwort lag beim BK_{Ca}-Kanal WT bei $14,81 \pm 1,37$ (n = 9), bei der S317R Mutante des BK_{Ca}- Kanals bei $12,5 \pm 1,27$ (n = 8).

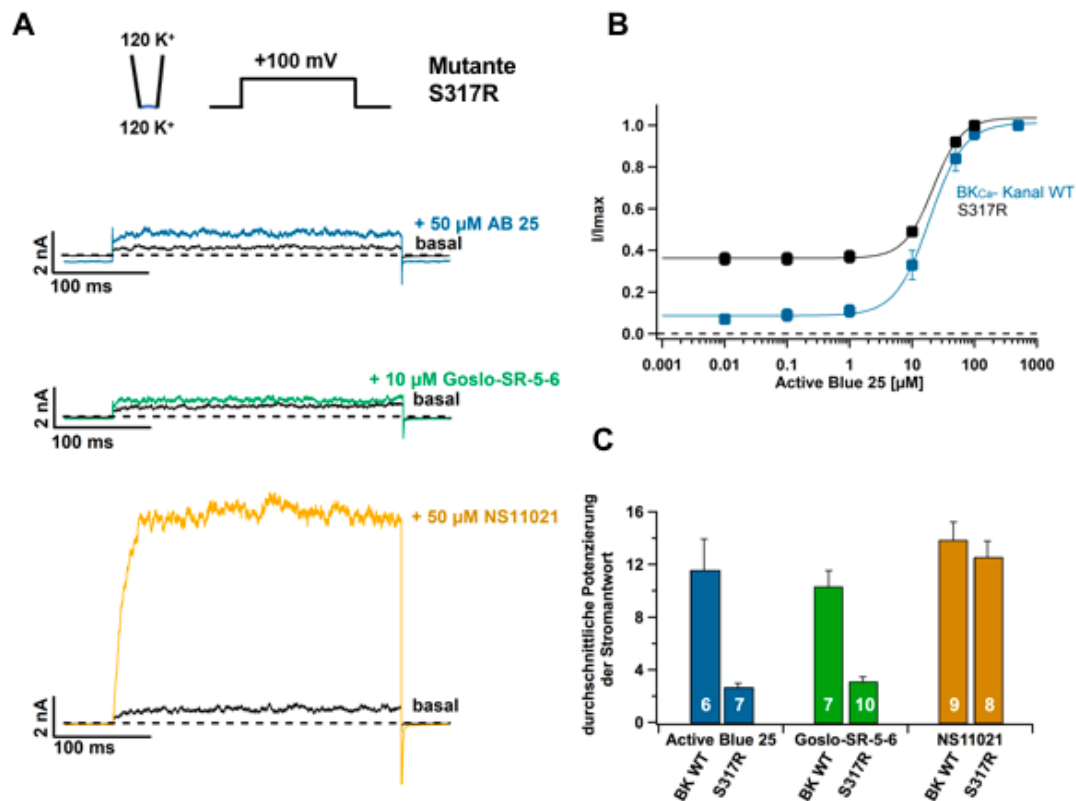


Abbildung 30: Vergleich der jeweiligen Aktivierungen der Mutante S317R des BK_{Ca}-Kanals durch Active Blue 25, GoSlo-SR-5-6 und NS11021. (A) Ströme der Mutante S317R des BK_{Ca}-Kanals, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4, einer Spannung von +100 mV und symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär: 120 mM K⁺). Schwarze Traces: basaler Strom, Ströme der Mutante S317R des BK_{Ca}-Kanals nach Applikation von 50 µM Active Blue 25 (blauer Trace), 10 µM GoSlo-SR-5-6 (grüner Trace) und 50 µM NS11021 (orangener Trace) (B) Blaue Dosis-Wirkungs-Kurve: Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch Active Blue 25, gefittet mit der Hill-Gleichung (EC₅₀ = $14,77 \pm 2,72$, HK = $2,84 \pm 0,76$, n = 11). Schwarze Dosis-Wirkungs-Kurve: Aktivierung der Mutante S317R des BK_{Ca}-Kanals durch Active Blue 25, gefittet mit der Hill-Gleichung (EC₅₀ = $22,32 \pm 2,03$, HK = $2,02 \pm 0,16$, n = 7). Jeder Datenpunkt gibt den berechneten Mittelwert ± SEM wieder (C) Vergleich der Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals Wildtyps und der Mutante S317R. Die durchschnittliche Potenzierung der Stromantwort wurde jeweils für den BK_{Ca}-Kanal WT und die Mutante S317R nach Applikation von 50 µM Active Blue 25, 10 µM GoSlo-SR-5-6 und 50 µM NS11021 dargestellt.

3.5.3 Effekt von Mutante Y318S

Die Aminosäure Y318 des BK_{Ca}-Kanals wurde als eine beteiligte Aminosäure an der Bindung der Omega-3-Fettsäure Docosahexaensäure beschrieben. Die Aktivierung der Mutante Y318S durch Active Blue 25 zeigte sich im Vergleich zum BK_{Ca}-Kanal Wildtyp nahezu unverändert. Die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) lag beim BK_{Ca}-Kanal Wildtyp bei $14,77 \pm 2,72$ (n = 11) und bei der Mutante Y318S bei $16,47 \pm 2,18$ (n = 10).

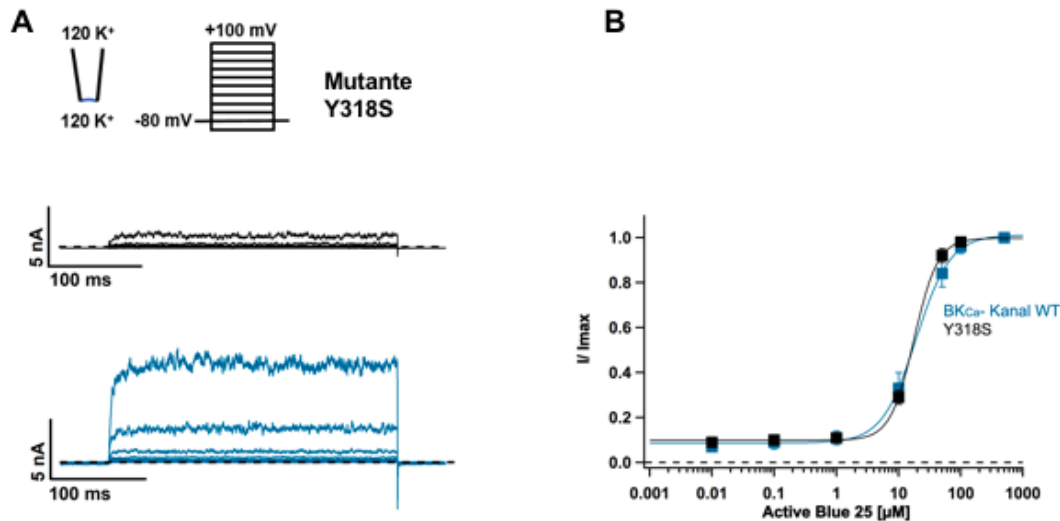


Abbildung 31: Aktivierung der Mutante Y318S des BK_{Ca}-Kanals durch Active Blue 25. (A) Ströme der Mutante Y318S des BK_{Ca}-Kanals, gemessen bei einem pH-Wert von 7,4, einer Spannung von -100 mV bis +100 mV (Zunahme jeweils um 20 mV) und symmetrisch Kalium (extrazellulär: 120 mM K⁺, intrazellulär: 120 mM K⁺), blaue Stromantwort: Ströme der Mutante Y318S des BK_{Ca}-Kanals vom selben Patch nach Applikation von 50 μM Active Blue 25 (B) Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven des BK_{Ca}-Kanals und der Mutante Y318S des BK_{Ca}-Kanals. Blaue Dosis-Wirkungs-Kurve: Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals WT durch Active Blue 25 ($EC_{50} = 14,77 \pm 2,72$, $HK = 2,84 \pm 0,76$, $n = 11$). Schwarze Dosis-Wirkungs-Kurve: Aktivierung der Mutante Y318S des BK_{Ca}-Kanals durch Active Blue 25 ($EC_{50} = 16,47 \pm 2,18$, $HK = 4,09 \pm 0,75$, $n = 10$).

4. Besprechung der Ergebnisse (Diskussion)

Der BK_{Ca}-Kanal reguliert viele zelluläre Funktionen wie die neuronale Erregbarkeit, die Repolarisation des Aktionspotentials, die Neurotransmitter- und Hormonfreisetzung, die Einstellung der Cochlea-Haarzellen, die angeborene Abwehr, den transepithelialen Transport, den Tonus der glatten Muskulatur im vaskulären, uterinen und gastrointestinalen Trakt sowie in der Harnblase (Bentzen et al., 2007). Während eines Aktionspotentials wird der BK_{Ca}-Kanal durch Membrandepolarisation und einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration aktiviert und generiert durch ausströmende Kaliumionen eine Hyperpolarisation und eine abnehmende Erregbarkeit der Zelle (Bailey et al., 2019; Bentzen et al., 2007). Eine BK_{Ca}-Kanal Aktivierung reduziert in neuronalen und muskulären Zellen die neuronalen Feuerungsraten, die präsynaptische Neurotransmitterfreisetzung sowie die Muskelkontraktion und den Muskeltonus (Contet et al., 2016; Jaggar et al., 2000; Tricarico & Mele, 2017). BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren bewirken einen dämpfenden Effekt auf die zelluläre Erregbarkeit und zeigen therapeutisches Potential in der Behandlung verschiedener Krankheitszustände wie Epilepsie, Ataxie oder ischämischen Perfusionsstörungen. Folglich wurden viele Aktivatoren entwickelt, deren präzise Wirkmechanismen und Bindungsstellen jedoch meist noch nicht im Detail bekannt sind.

Mein Bestreben war es, neue BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren zu identifizieren und zusammen mit etablierten BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren zu charakterisieren. Dabei sollten die entsprechenden Wirkmechanismen und Bindungsstellen näher untersucht werden.

Des Weiteren wollte ich zu einem besseren Verständnis des BK_{Ca}-Kanalschaltverhaltens beitragen. Die Aktivierung von Kaliumkanälen basiert auf zwei grundlegenden Gating-Mechanismen, die deren Öffnung steuern: die Erweiterung des „unteren“ Gates (sog. Helix-Bundle Crossing) am intrazellulären Poreneingang, wie sie von K_{ir}- und K_v-Kanälen genutzt wird, sowie die Aktivierung eines „oberen“ Gates (sog. Selektivitätsfilter-Gate). Die derzeitige Hypothese ist, dass der BK_{Ca}-Kanal sowohl ein zytoplasmatisches Gate an der HBC-Region als auch ein Selektivitätsfilter-Gate besitzt (Chen et al., 2014; Horrigan & Aldrich, 2002; Jia et al., 2018; Magleby, 2003; Schewe et al., 2019; Wilkens & Aldrich, 2006; Y. Zhou et al., 2011). Allerdings wird auch ein hydrophober Gating-Mechanismus in der tiefen Porenregion des BK_{Ca}-Kanals diskutiert (Jia et al., 2018). Die Aktivierung des Selektivitätsfilters wurde in den letzten zwei Jahrzehnten für K_{2P}-Kanäle angenommen (Bagriantsev et al., 2011; Niemeyer et

al., 2016). Neelsen et al. (2024) konnten in den kürzlich aufgelösten Cryo-EM-Strukturen von TASK-1 und TASK-2 auch ein zytoplasmatisches Gate nachweisen. In hERG-Kanälen koexistieren das Helix-Bundle Crossing und das Gate innerhalb des Selektivitätsfilters (Smith et al., 1996; Vandenberg et al., 2017).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der BK_{Ca}-Kanal nicht nur durch etablierte BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren aktiviert wird, sondern auch durch die als spezifisch für andere Ionenkanäle geltenden Aktivatoren. Auch konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch die negativ geladenen Aktivatoren deutlich den inhibierenden Effekt der quartären Ammoniumverbindung Tetrahexylammonium reduziert. Da die Bindungsstelle von quartären Ammoniumverbindungen, wie Tetrahexylammonium, bereits bekannt ist und unmittelbar unterhalb des Selektivitätsfilters des BK_{Ca}-Kanals liegt (Lenaeus et al., 2014), implizieren die Ergebnisse eine direkte Konkurrenz der negativ geladenen Aktivatoren und quartären Ammoniumverbindungen um eine teils überlappende Bindungsstelle.

Zur Untersuchung eines Gates am zytoplasmatischen Poreneingang, ähnlich Helix-Bundle Crossing, ist in dieser Arbeit zudem ein Teil der porenbildenden S6-Helix, die einerseits distal in ein unteres Gate übergeht und gleichzeitig als gating-relevanter Abschnitt beschrieben ist (Chen et al., 2014; Y. Zhou et al., 2011), untersucht worden. Dabei konnte, wie bereits von Chen et al. (2014) veröffentlicht, bestätigt werden, dass die Mutante A316E des BK_{Ca}-Kanals konstitutiv geöffnet ist. Der durch Webb et al. (2015) reduzierte wirkstoffvermittelte Effekt von GoSlo-SR-5-6 auf die Mutante S317R konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Außerdem konnten die Ergebnisse zeigen, dass die Mutation S317R auch die apparente Affinität von Active Blue 25 im BK_{Ca}-Kanal verringert. Der aktivierende Effekt von NS11021 blieb hingegen unverändert. Die Mutation Y318S, bekannt für die Beteiligung an der Bindung der Docosahexaensäure (Hoshi, Xu, et al., 2013), reduzierte nicht die apparente Affinität von Active Blue 25.

4.1 Polypharmakologie der Kaliumkanäle- Fokus auf den BK_{Ca}-Kanal

In den Experimenten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der BK_{Ca}-Kanal nicht nur durch die etablierten BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren NS11021 (Bentzen et al., 2007), GoSlo-SR-5-6 und dem GoSlo-SR-5-6 Strukturhomolog Active Blue 25 (Roy et al., 2012) aktiviert wird, sondern auch durch die zuvor als selektiv beschriebenen hERG-Kanal Aktivatoren NS3623 (Hansen et

al., 2006) und PD-118057 (J. Zhou et al., 2005) sowie durch den K_{2P} -Kanal Aktivator ML67-33 (Bagriantsev et al., 2013).

Allen untersuchten Substanzen, die in dieser Arbeit einen aktivierenden Effekt auf den BK_{Ca} -Kanal zeigten, ist gemeinsam, dass sie im physiologischen pH-Bereich (7,37-7,43) deprotoniert vorliegen und daher einen negativ geladenen Molekülteil besitzen: NS11021 (Tetrazol), GoSlo-SR-5-6 (Sulphonat), NS3623 (Tetrazol), PD-118057 (Carboxylat) und ML67-33 (Tetrazol) (siehe Abbildung 32). Das erforderliche Vorhandensein einer negativ geladenen Gruppe konnte bereits für die Aktivierung des BK_{Ca} -Kanals durch GoSlo-SR-5-6 und für die Aktivierung des K_{2P} -Kanals durch ML67-33 gezeigt werden (Bagriantsev et al., 2013; Roy et al., 2012).

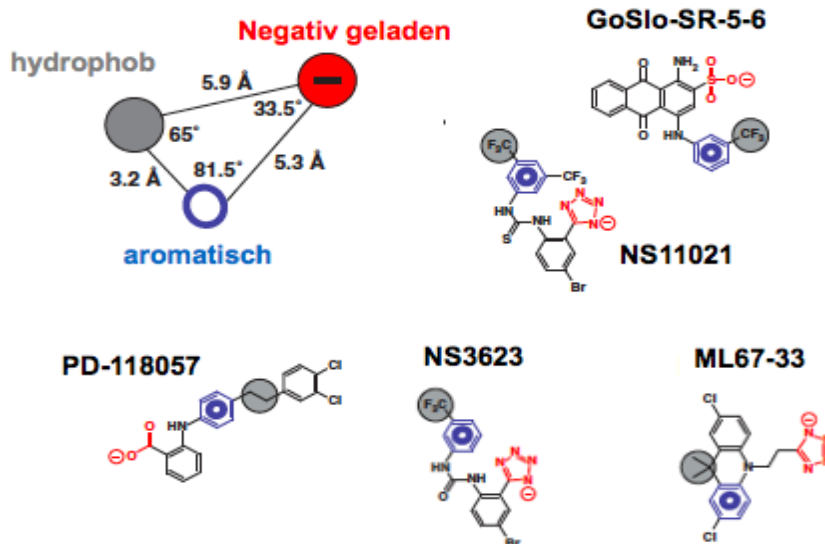


Abbildung 32: Übersicht über die negativ geladenen BK_{Ca} - (NS11021, GoSlo-SR-5-6), hERG- (PD-118057, NS3623) und K_{2P} - (ML67-33) Kanal Aktivatoren. Das Pharmakophor dieser Aktivatoren besteht aus einem aromatischen (blau), hydrophoben (grau) und einem negativ geladenen (rot) Anteil. Bindungslängen und Winkel sind angegeben (Schewe et al., 2019).

Am Physiologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel konnte die Aktivierung durch diese negativ geladenen Aktivatoren auch für K_{2P} -Kanäle, wie den TALK-Kanal und die TREK- und TRAAK-Subfamilie, sowie für den hERG-Kanal und teilweise für den BK_{Ca} -Kanal bestätigt werden. Die Aktivierung des „Nicht-Zielkanals“, des BK_{Ca} -Kanals, durch diese eigentlich als selektiv beschriebenen Aktivatoren ist in dieser Arbeit systematisch untersucht worden und zeigt eine unerwartete Polypharmakologie der NCAs, welche keinen kanalspezifischen Aktivierungsmechanismus, sondern vielmehr einen gemeinsamen Mechanismus in den verschiedenen Kaliumkanälen vermuten lässt. Ein gemeinsames Merkmal

aller NCA-empfindlichen K^+ -Kanäle ist mitunter ein Selektivitätsfilter-Gate, ein Mechanismus, der eng mit der Ionenpermeation gekoppelt ist.

Interessanterweise konnte unsere Arbeitsgruppe auch zeigen, dass diese Kopplung bei den NCA-empfindlichen K_2P -Kanälen, dem hERG-Kanal und dem BK_{Ca} -Kanal, zu einer ausgeprägten Aktivierung durch Rubidiumionen führte. Im Gegensatz dazu zeigte Rb^+ keinerlei aktivierenden Effekt auf K^+ -Kanäle, die ausschließlich am Helix-Bundle Crossing geschaltet werden, wie K_{ir} - und die meisten K_v -Kanäle. Die Aktivierung des BK_{Ca} -Kanals durch permeierende Rubidiumionen konnte in dieser Arbeit bestätigt werden und ist ein Indiz für ein Selektivitätsfilter-Gate im BK_{Ca} -Kanal. Dabei ist noch einmal gezeigt, dass intrazellulär appliziertes Rb^+ den BK_{Ca} -Kanal aktiviert.

4.2 Negativ geladene Aktivoren binden in räumlicher Nähe von quartären Ammoniumverbindungen

Zudem konnte in den Experimenten dieser Arbeit mittels QA^+ -Kompetitionsversuchen gezeigt werden, dass eine Aktivierung des BK_{Ca} -Kanals durch die negativ geladenen Aktivoren NS11021, NS3623, PD-118057 und ML67-33 deutlich den inhibierenden Effekt der quartären Ammoniumverbindung Tetrahexylammonium reduzierte. Da die Bindungsstelle von Tetrahexylammonium bereits bekannt ist und sich unmittelbar unterhalb des Selektivitätsfilters des BK_{Ca} -Kanals befindet (Lenaeus et al., 2014), implizieren die Ergebnisse eine direkte Konkurrenz der negativ geladenen Aktivoren und der quartären Ammoniumverbindung um eine teils überlappende Bindungsstelle. Die NCAs binden somit in räumlicher Nähe von quartären Ammoniumverbindungen unmittelbar unterhalb des Selektivitätsfilters in der inneren Pore des BK_{Ca} -Kanals.

Mittels Cystein-Scanning-Mutagenese und Molekulardynamik (MD)-Simulationen konnte der Bindungsort des negativ geladenen Aktivators NS11021 im BK_{Ca} -Kanal durch unsere Arbeitsgruppe bestimmt werden. Die MD-Simulationen bestätigen die Bindungsstelle von NS11021 unmittelbar unterhalb des Selektivitätsfilters in der inneren Pore des BK_{Ca} -Kanals (siehe Abbildung 33).

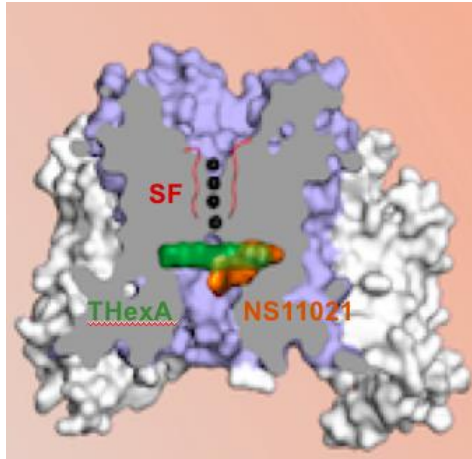


Abbildung 33: Darstellung der gemeinsamen Bindungsstelle von Tetrahexylammonium und NS11021 unmittelbar unterhalb des Selektivitätsfilters in der inneren Pore des BK_{Ca}-Kanals. Die QA⁺-Verbindung Tetrahexylammonium (grün) kompetiert mit NS11021 (orange) um die Bindungsstelle unmittelbar unterhalb des Selektivitätsfilters (rot), schwarz dargestellt sind die Kaliumionen (Schewe et al., 2019).

Dabei projiziert der negativ geladene Tetrazolring von beispielsweise NS11021 in die Porenkavität unmittelbar unterhalb des Selektivitätsfilters und erhöht durch elektrostatische Wechselwirkungen die Kaliumkonzentration in der Porenkavität. Die erhöhte K⁺-Konzentration steht im direkten Zusammenhang mit der Aktivierung des Selektivitätsfilters und bewirkt einen stabilen Zustand des Selektivitätsfilter-Gates im BK_{Ca}-Kanal. Die Bindungsstelle und der beschriebene Wirkmechanismus von NS11021 kann auf die weiteren in dieser Arbeit untersuchten negativ geladenen Aktivatoren GoSlo-SR-5-6, NS3623, PD-118057 und ML67-33 übertragen werden, wobei die Aktivatoren wahrscheinlich durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den permeierenden Ionen den Selektivitätsfilter direkt in seinem aktivierten Zustand stabilisieren können. Nicht auszuschließen bleibt dennoch, dass auch die Wechselwirkungen des Molekülgrundkörpers mit dem Kanal zu strukturellen Veränderungen führen, die eine Aktivierung des Selektivitätsfilters und somit des BK_{Ca}-Kanals bewirken.

Rockman et al. (2020) konnten bestätigen, dass NS11021 innerhalb der Pore des BK_{Ca}-Kanals bindet. Der aktivierende Effekt von NS11021 war dabei unabhängig von Ca²⁺ und der zytosolischen Domäne des BK_{Ca}-Kanals. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass NS11021 die Offenwahrscheinlichkeit des BK_{Ca}-Kanals bei negativen Spannungen erhöht, bei denen sich die spannungsvermittelnde Domäne im Ruhezustand befindet. Somit findet die Aktivierung durch NS11021 unabhängig von der spannungsvermittelnden Domäne sowie der zytosolischen Domäne statt.

Allerdings merkten Rockman et al. (2020) an, dass nach der Theorie unseres Arbeitskreises sich die Einzelleitfähigkeit des BK_{Ca}-Kanals erhöhen müsste, was auch für den TREK-2 Kanal bei der Aktivierung durch BL-1249 gezeigt werden konnte. Rockman et al. (2020) konnten bei

der Aktivierung durch NS11021 keine substantielle Zunahme der Einzelleitfähigkeit des BK_{Ca}-Kanals bei negativen Spannungen beobachten, wohingegen die durchschnittliche Öffnungszeit des BK_{Ca}-Kanals zugenommen hatte. Dies impliziert Unterschiede in der Wirkungsweise von NS11021 am BK_{Ca}-Kanal im Vergleich zum beispielsweise TREK-2 Kanal. Es ist aber durchaus möglich, dass die negative Ladung der NCAs den Ionenbesatz des Selektivitätsfilters im BK_{Ca}-Kanal ändern und dadurch zur Aktivierung des Selektivitätsfilters führen kann, ohne dabei die Einzelkanalleitfähigkeit zu verändern. Weitere Untersuchungen sind hier notwendig.

4.3 Systematische Untersuchung der porenformenden TM-Domäne S6

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit ein Teil der porenbildenden Transmembran-Domäne S6 des BK_{Ca}-Kanals, die einerseits distal in ein unteres Gate übergeht und gleichzeitig als gating-relevanter Abschnitt beschrieben ist (Chen et al., 2014; Y. Zhou et al., 2011), untersucht.

4.3.1 Neuorientierung der Seitenkette der Aminosäure A316 resultiert in BK_{Ca}-Kanal Öffnung

In vorangegangenen Studien wurden Aminosäuren der porenformenden TM-Domäne S6 des BK_{Ca}-Kanals mittels Mutagenese und elektrophysiologischen Ableitungen untersucht (Chen et al., 2014; Y. Zhou et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass ein Austausch der hydrophoben, ungeladenen Aminosäuren L312, A313 und A316, die die tiefe Porenregion auskleiden, durch Aminosäuren mit polaren oder geladenen Seitenketten zu einem konstitutiv geöffneten BK_{Ca}-Kanal führte. Besonders der Austausch durch die negativ geladene, hydrophile Aminosäure Aspartat verursachte eine drastische Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Laut dem vorgeschlagenen Mechanismus von Chen et al. (2014) bewegen sich die Aminosäuren L312, A313 und A316 während der Kanalaktivierung in die wassergefüllte Pore hinein. Ein Austausch der Seitenketten dieser Aminosäuren durch hydrophile Gruppen würde diese Bewegung begünstigen und zu einer ständigen Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals führen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass ein Austausch der hydrophoben/unpolaren, ungeladenen Aminosäure A316 durch das hydrophile/polare, negativ geladene Glutamat (E) in einem konstitutiv geöffneten BK_{Ca}-Kanal resultierte. Die Mutante A316E des BK_{Ca}-Kanals wies einen Verlust der Spannungsabhängigkeit auf und zeigte bereits bei negativen Membranpotentialen eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit. Funktionell war die A316E-Mutante nicht mehr durch den BK_{Ca}-Kanal-Aktivator Active Blue 25 oder durch

Rubidiumionen aktivierbar, was darauf hinweist, dass der Kanal durch diese Mutation nahezu maximal geöffnet ist.

4.3.2 Die Mutante S317R reduziert den Effekt von Active Blue 25 und GoSlo-SR-5-6 und nicht von NS11021

In vorangegangenen Studien wurde bereits an der Lokalisation S317 die Aminosäure Serin durch die Aminosäure Arginin (R) ausgetauscht und ein reduzierter Effekt von GoSlo-SR-5-6 auf die Mutante S317R nachgewiesen. Außerdem konnte eine Interaktion der Aminosäure S317 mit weiteren Aminosäuren (I326 im S6-Segment und L227 im S4/S5-Linker) während der GoSlo-SR-5-6-Bindung gezeigt werden (Webb et al., 2015).

Die elektrophysiologischen Messungen dieser Arbeit zeigten bei der Mutante S317R im Vergleich zum BK_{Ca}-Kanal Wildtyp eine vergleichbare Stromgröße und Spannungsabhängigkeit. Es konnte bestätigt werden, dass die Mutation S317R die apparente Affinität von GoSlo-SR-5-6 im BK_{Ca}-Kanal verringert. Die apparente Affinität der Grundsubstanz Active Blue 25 war ähnlich reduziert. Der aktivierende Effekt von NS11021 auf die Mutante S317R war hingegen unverändert. Diese Ergebnisse implizieren wie erwartet eine gemeinsam genutzte Bindungsstelle von GoSlo-SR-5-6 und Active Blue 25. Die Bindung von NS11021 scheint hingegen nicht abhängig von der Aminosäure S317 zu sein. MD-Simulationen bestätigen diese Annahme (siehe Abbildung 34). Daher sind die Bindungsstellen von NS11021 und GoSlo-SR-5-6 im BK_{Ca}-Kanal nicht identisch bzw. die interagierenden Aminosäurereste unterschiedlich.

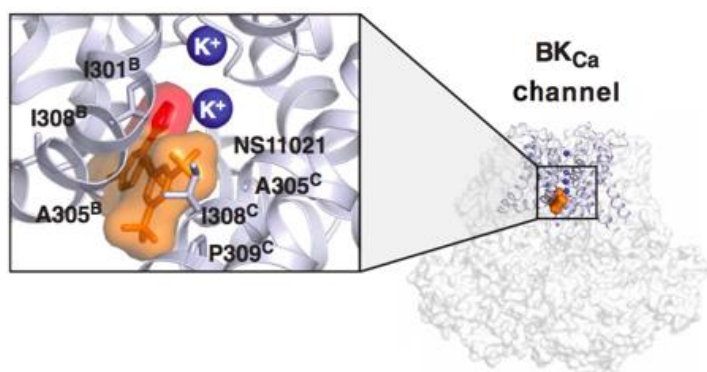


Abbildung 34: Darstellung der Struktur des BK_{Ca}-Kanals (Proteindatenbank 5TJI) und der bevorzugten Bindungsstelle von NS11021. Der negativ geladene Tetrazolring (rot) von NS11021 interagiert mit den Kaliumionen unterhalb des Selektivitätsfilters, die Aminosäurereste in der räumlichen Nähe von NS11021 sind hervorgehoben (Schewe et al., 2019).

4.3.3 Unveränderter Effekt von Active Blue 25 auf die Mutante Y318S

Des Weiteren konnten die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die für ihre Unempfindlichkeit gegenüber der Omega-3-Fettsäure Docosahexaensäure bekannte Mutante Y318S des BK_{Ca}-Kanals (Hoshi, Xu, et al., 2013), eine unveränderte Aktivierung durch Active Blue 25 im Vergleich zum BK_{Ca}-Kanal Wildtyp zeigt.

Hoshi, Xu, et al. (2013) zeigten allerdings auch einen unveränderten Effekt der α -Linolensäure (Kettenlänge von 18 Kohlenstoffatomen) und der Omega-6-Fettsäure Arachidonsäure (20 Kohlenstoffatome) auf die Mutante Y318S. Somit ist die Aminosäure Y318 eine beteiligte strukturelle Komponente der Docosahexaensäure-Bindungsstelle, aber nicht beteiligt an der Bindung der weiteren Fettsäuren α -Linolensäure und Arachidonsäure oder des negativ geladenen Aktivators Active Blue 25.

4.3.4 Hydrophobes Gating

Jia et al. (2018) stellen unter Berücksichtigung von Scan-Mutagenese-Daten und der atomaren Cryo-EM-Struktur des *Aplysia californica* BK_{Ca}-Kanals (Hite et al., 2017; X. Tao et al., 2017) die Hypothese auf, dass der BK_{Ca}-Kanal möglicherweise kein klassisches Selektivitätsfilter-Gate besitzt. Stattdessen vermuten sie einen hydrophoben Gating-Mechanismus im BK_{Ca}-Kanal, bei dem hydrophobe Aminosäuren in der inneren Pore, insbesondere in der HBC-Region, eine energetische Barriere bilden, die den Ionendurchtritt verhindert. In der geschlossenen Konformation kann der BK_{Ca}-Kanal sich hydrophoben, entnetzenden Umwandlungen (dewetting) unterziehen, um eine wasserfreie Pore mit einer hohen Energie-Barriere zu generieren, die impermeabel für Kaliumionen und Wasser ist (Jia et al., 2018).

Laut Jia et al. (2018) bilden die ungeladenen, hydrophoben Aminosäuren L312, A313, F315 und A316, welche die tiefe Porenregion auskleiden, die Grundlage für die Hydrophobizität der Pore. Sie sind jedoch nicht in der Lage, die entnetzenden Umwandlungen eigenständig zu initiieren. Der Gating-Mechanismus wird demnach durch eine strukturelle Änderung der Pore ausgelöst, die unabhängig voneinander und synergetisch durch die Ca²⁺-Bindung sowie durch die Bewegung der spannungsvermittelnden TM-Domäne S4 reguliert wird.

Die in dieser Arbeit gezeigte spannungsabhängige Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch intrazelluläre Rubidiumionen widerspricht zumindest einem ausschließlich hydrophoben Gating-Mechanismus und ist ein Hinweis auf ein Selektivitätsfilter-Gate im BK_{Ca}-Kanal. Das

Selektivitätsfilter-Gate ist eng gekoppelt mit der Ionenpermeation (McCoy & Nimigean, 2012; Schewe et al., 2016). Diese Kopplung führt zu einer ausgeprägten Aktivierung durch Rubidiumionen, welche den aktivierten Zustand des Selektivitätsfilter-Gates stabilisieren. Es ist aber auch denkbar, dass sowohl der Selektivitätsfilter als auch ein hydrophobes Gating existieren. In diesem Fall könnte die Bindung der NCAs Wasser in der Pore stabilisieren (Benetzung der Pore) und gleichzeitig den Ionenbesatz des Selektivitätsfilters verändern und durch beide Mechanismen zur Kanalaktivierung führen.

Ein Hinweis auf die Bedeutung des hydrophoben Gating-Mechanismus im BK_{Ca}-Kanal ergibt sich aus der in dieser Arbeit untersuchten Mutation A316E. Die hydrophobe Aminosäure Alanin wurde durch das hydrophile, negativ geladene Glutamat ersetzt, was zu einer konstitutiven Öffnung des Kanals führte. In der geschlossenen Konformation bilden hydrophobe Aminosäuren wie A316 eine energetische Barriere, die den Ionen- und Wassertransport verhindert. Der Austausch von Alanin gegen das polare Glutamat destabilisiert diese Barriere, wodurch die Pore durchlässig für Wasser wird und der Kanal dauerhaft geöffnet bleibt. Diese Ergebnisse bestätigen die Bedeutung der Hydrophobizität für das Gating-Verhalten des BK_{Ca}-Kanals und legen nahe, dass der hydrophobe Mechanismus möglicherweise parallel zum klassischen Selektivitätsfilter-Gate existiert.

4.4 Schlusswort und Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigte Aktivierung des „Nicht-Zielkanals“, des BK_{Ca}-Kanals, durch die eigentlich als selektiv beschriebenen hERG- und K2P-Kanal Aktivatoren zeigt eine unbeabsichtigte Polypharmakologie der negativ geladenen Aktivatoren. Polypharmakologie beschreibt die Eigenschaft eines Wirkstoffs, nicht nur eine spezifische Zielstruktur, sondern gleichzeitig mehrere Zielstrukturen zu beeinflussen. Diese Erkenntnis spricht weniger für kanalspezifische Aktivierungsmechanismen, sondern vielmehr für einen gemeinsamen Wirkmechanismus, der verschiedenen Kaliumkanälen gemeinsam sein könnte.

Die Polypharmakologie der NCAs stellt eine Herausforderung für die gezielte Entwicklung von Medikamenten dar, bietet jedoch gleichzeitig Potential für therapeutische Vorteile. So könnte die gleichzeitige Aktivierung mehrerer Kaliumkanäle in der medizinischen Akutversorgung von Nutzen sein, beispielsweise bei der Behandlung von epileptischen Anfällen oder ischämischen Schlaganfällen, indem mehrere neuroprotektive Kaliumkanäle durch einen

negativ geladenen Aktivator simultan geöffnet werden. Allerdings erschwert die Polypharmakologie von BK_{Ca}-, K₂P- und hERG-Kanal-Aktivatoren die Entwicklung spezifischer Wirkstoffe, die nur eine bestimmte Kaliumkanal-Untergruppe aktivieren. Strukturelle Unterschiede zwischen den Kanälen könnten dennoch eine selektive BK_{Ca}-Kanal Aktivierung ermöglichen. Ein mögliches Vorgehen wäre die schlichte Entwicklung von sterisch größeren BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren, welche nicht in die Kavität von K₂P- und hERG-Kanälen passen und nur in der Pore des BK_{Ca}-Kanals binden können.

Neben der gezeigten Polypharmakologie leisten die Ergebnisse dieser Arbeit auch einen Beitrag zum Verständnis des Gating-Mechanismus des BK_{Ca}-Kanals. Insbesondere das Vorhandensein eines Selektivitätsfilter-Gates wurde durch die Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch negativ geladene Aktivatoren wie NS11021, GoSlo-SR-5-6, NS3623, PD-118057 und ML67-33 unterstützt. Diese Aktivatoren binden, wie durch QA⁺-Kompetitionsversuche nachgewiesen wurde, unmittelbar unterhalb des Selektivitätsfilters in der inneren Pore – einem Bereich, der auch für die Interaktion mit quartären Ammoniumverbindungen, wie Tetrahexylammonium, bekannt ist. Die kompetitive Bindung der NCAs an dieser Stelle weist auf eine teils überlappende Bindungsstelle mit Tetrahexylammonium hin.

Durch elektrostatische Wechselwirkungen erhöhen die negativ geladenen Aktivatoren die Kaliumkonzentration in der Porenkavität und könnten dadurch den Kaliumbesatz des Selektivitätsfilters erhöhen und dadurch aktivierend wirken. Dieser Mechanismus impliziert eine ähnlich enge Kopplung zwischen Ionenbesatz und Gating, wie dies bereits für K₂P-Kanäle beschrieben ist (Neelsen et al., 2024; Schewe et al., 2019). Darüber hinaus wird diese Kopplung durch die Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch Rubidiumionen unterstützt. Rb⁺ induziert eine spezifische Aktivierung bei Kanälen mit Selektivitätsfilter-Gate, während Kanäle, die ausschließlich über ein Helix-Bundle Crossing gesteuert werden, wie K_{ir}- oder die meisten K_v-Kanäle, davon unbeeinflusst blieben (Schewe et al., 2019).

Neben der Bedeutung des Selektivitätsfilter-Gates konnten die Ergebnisse dieser Arbeit auch die bereits beschriebene Bedeutung von hydrophoben Wechselwirkungen im BK_{Ca}-Kanal bestätigen. In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (Chen et al., 2014) führt die Mutation A316E, bei der die hydrophobe Aminosäure Alanin durch die polare, negativ geladene Aminosäure Glutamat ersetzt wurde, zu einer konstitutiven Öffnung des Kanals. Dies deutet

darauf hin, dass hydrophobe Aminosäuren in der HBC-Region eine energetische Barriere darstellen, die den Ionendurchtritt reguliert. Der Austausch gegen eine polare Aminosäure destabilisiert diese Barriere und erhöht die Durchlässigkeit für Wasser und Ionen. Damit wird die Rolle hydrophober Wechselwirkungen im HBC-Bereich als unterstützender, aber nicht alleiniger Gating-Mechanismus möglich.

Die A316E-Mutante kann als Argument sowohl für den HBC-Gating-Mechanismus als auch für den hydrophoben Gating-Mechanismus im BK_{Ca}-Kanal gesehen werden, da sie beide Mechanismen beeinflusst. Zum einen führt der Austausch der hydrophoben Aminosäure durch eine polare, negativ geladene Aminosäure zu einer Veränderung der S6-Helices und könnte so das HBC-Gate stabilisieren und die Offenwahrscheinlichkeit erhöhen. Zum anderen verändert dieser Austausch die hydrophoben Wechselwirkungen in der Pore, was ebenfalls zu einer konstitutiven Öffnung des Kanals führt und einen hydrophoben Gating-Mechanismus stützt.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse die Komplexität der BK_{Ca}-Kanal-Regulation. Weitere Studien sind notwendig, um die molekularen Grundlagen der Gating-Mechanismen vollständig zu entschlüsseln und gezielte therapeutische Ansätze zu entwickeln, um diese zu beeinflussen. Dabei könnte insbesondere die Untersuchung der Polypharmakologie und der strukturellen Unterschiede zwischen den Kaliumkanälen wertvolle Ansätze für die Entwicklung von selektiven Wirkstoffen liefern.

5. Zusammenfassung

Der kalziumaktivierte Kaliumkanal (BK_{Ca}-Kanal) gehört zur Gruppe der Kaliumkanäle mit sechs Transmembran-Domänen und einer Poren-Domäne. Während eines Aktionspotentials wird der BK_{Ca}-Kanal durch Membrandepolarisation und Kalziumeinstrom durch spannungsabhängige Kalziumkanäle in den Intrazellulärraum aktiviert. Der durch den BK_{Ca}-Kanal generierte Kaliumauswärtsstrom führt zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials und einem Schließen der Kalziumkanäle und beendet somit das Aktionspotential. Die Regulation der zellulären Erregbarkeit durch pharmakologische Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals ist ein vielversprechendes Konzept zur Behandlung von Krankheiten wie Epilepsie, Hypertonie, Blasenüberaktivität oder erektiler Dysfunktion. Folglich wurden viele BK_{Ca}-Kanal Aktivatoren entwickelt, deren Bindungsstellen und präzise Wirkmechanismen größtenteils nicht bekannt sind, sodass die Entwicklung eines rationalen Wirkstoffdesigns noch nicht möglich ist. Mein Bestreben war, Aktivatoren mit strukturellen Ähnlichkeiten hinsichtlich ihrer Wirkung auf den BK_{Ca}-Kanal zu untersuchen und ihren gemeinsamen Wirkmechanismus und Bindungsort zu identifizieren. BK_{Ca}-Kanal spezifische Aktivatoren, aber auch spezifische Aktivatoren anderer Kaliumkanäle, wie den Zwei-Porendomänen (K_{2P})-Kaliumkanälen und den spannungsaktivierten, einwärts gleichrichtenden Kaliumkanälen in Herzmuskelzellen (human ether-a-gogo-related gene channel, hERG), wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf den BK_{Ca}-Kanal untersucht. Mittels der Patch-Clamp-Methode wurden die BK_{Ca}-Kanalströme gemessen. Als Expressionssystem wurden Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* gewählt, in die in vitro synthetisierte RNA des zu untersuchenden BK_{Ca}-Kanals injiziert wurde. Die eigentlich als selektiv beschriebenen, negativ geladenen Aktivatoren (NCAs) aktivierten den Nicht-Zielkanal, den BK_{Ca}-Kanal, und zeigten eine unerwartete Polypharmakologie. Ergänzend wurden Kompetitionsversuche durchgeführt, um eine mögliche überlappende Bindungsstelle der negativ geladenen Aktivatoren und der als Kaliumkanal-Inhibitoren etablierten quartären Ammoniumverbindungen, deren Bindungsstelle bereits bekannt ist und unmittelbar unterhalb des Selektivitätsfilters in der inneren Pore des BK_{Ca}-Kanals liegt, zu untersuchen. Die Ergebnisse lassen eine überlappende Bindungsstelle der negativ geladenen Aktivatoren und der quartären Ammoniumverbindungen annehmen und stellen einen Beitrag für die Wirkstoffentwicklung dar, um langfristig die zelluläre Erregbarkeit mittels pharmakologischer Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals regulieren zu können.

6. Literaturverzeichnis

- Armstrong, C. M. (1966). Time course of TEA(+)-induced anomalous rectification in squid giant axons. *J Gen Physiol*, *50*(2), 491-503. doi:10.1085/jgp.50.2.491
- Armstrong, C. M. (1971). Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen Physiol*, *58*(4), 413-437. doi:10.1085/jgp.58.4.413
- Ashcroft, F. M. (2000). *Ion channels and disease : channelopathies*. San Diego: Academic Press.
- Bagriantsev, S. N., Ang, K. H., Gallardo-Godoy, A., Clark, K. A., Arkin, M. R., Renslo, A. R., & Minor, D. L., Jr. (2013). A high-throughput functional screen identifies small molecule regulators of temperature- and mechano-sensitive K₂P channels. *ACS Chem Biol*, *8*(8), 1841-1851. doi:10.1021/cb400289x
- Bagriantsev, S. N., Peyronnet, R., Clark, K. A., Honore, E., & Minor, D. L., Jr. (2011). Multiple modalities converge on a common gate to control K₂P channel function. *EMBO J*, *30*(17), 3594-3606. doi:10.1038/emboj.2011.230
- Bailey, C. S., Moldenhauer, H. J., Park, S. M., Keros, S., & Meredith, A. L. (2019). KCNMA1-linked channelopathy. *J Gen Physiol*, *151*(10), 1173-1189. doi:10.1085/jgp.201912457
- Bentzen, B. H., Nardi, A., Calloe, K., Madsen, L. S., Olesen, S. P., & Grunnet, M. (2007). The small molecule NS11021 is a potent and specific activator of Ca²⁺-activated big-conductance K⁺ channels. *Mol Pharmacol*, *72*(4), 1033-1044. doi:10.1124/mol.107.038331
- Bentzen, B. H., Olesen, S. P., Ronn, L. C., & Grunnet, M. (2014). BK channel activators and their therapeutic perspectives. *Front Physiol*, *5*, 389. doi:10.3389/fphys.2014.00389
- Brenner, R., Perez, G. J., Bonev, A. D., Eckman, D. M., Kosek, J. C., Wiler, S. W., . . . Aldrich, R. W. (2000). Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature*, *407*(6806), 870-876. doi:10.1038/35038011
- ChemicalBook. (2017). Retrieved from https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb7400191.htm
- Chen, X., Yan, J., & Aldrich, R. W. (2014). BK channel opening involves side-chain reorientation of multiple deep-pore residues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(1), E79-88. doi:10.1073/pnas.1321697111
- Coetzee, W. A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., . . . Rudy, B. (1999). Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci*, *868*, 233-285. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb11293.x
- Contet, C., Goulding, S. P., Kuljis, D. A., & Barth, A. L. (2016). BK Channels in the Central Nervous System. *Int Rev Neurobiol*, *128*, 281-342. doi:10.1016/bs.irm.2016.04.001
- Cui, J. (2020). The action of a BK channel opener. *J Gen Physiol*, *152*(6). doi:10.1085/jgp.202012571
- Demo, S. D., & Yellen, G. (1992). Ion effects on gating of the Ca(2+)-activated K⁺ channel correlate with occupancy of the pore. *Biophys J*, *61*(3), 639-648. doi:10.1016/S0006-3495(92)81869-6
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., . . . MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, *280*(5360), 69-77. doi:10.1126/science.280.5360.69
- Du, W., Bautista, J. F., Yang, H., Diez-Sampedro, A., You, S. A., Wang, L., . . . Wang, Q. K. (2005). Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder. *Nat Genet*, *37*(7), 733-738. doi:10.1038/ng1585

- Dumont, J. N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol*, *136*(2), 153-179. doi:10.1002/jmor.1051360203
- Dworetzky, S. I., Boissard, C. G., Lum-Ragan, J. T., McKay, M. C., Post-Munson, D. J., Trojnacki, J. T., . . . Gribkoff, V. K. (1996). Phenotypic Alteration of a Human BK (hSlo) Channel by hSlo β Subunit Coexpression: Changes in Blocker Sensitivity, Activation/Relaxation and Inactivation Kinetics, and Protein Kinase A Modulation. *The Journal of Neuroscience*, *16*(15), 4543-4550. doi:10.1523/jneurosci.16-15-04543.1996
- Enyedi, P., & Czirjak, G. (2010). Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev*, *90*(2), 559-605. doi:10.1152/physrev.00029.2009
- Fakler, B., & Jonas, P. (2011). Grundlagen zellulärer Erregbarkeit. In R. F. Schmidt, F. Lang, & M. Heckmann (Eds.), *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie* (pp. 49-75). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Feletou, M. (2009). Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br J Pharmacol*, *156*(4), 545-562. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00052.x
- Gessner, G., Cui, Y. M., Otani, Y., Ohwada, T., Soom, M., Hoshi, T., & Heinemann, S. H. (2012). Molecular mechanism of pharmacological activation of BK channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(9), 3552-3557. doi:10.1073/pnas.1114321109
- Gueguinou, M., Chantome, A., Fromont, G., Bougnoux, P., Vandier, C., & Potier-Cartereau, M. (2014). KCa and Ca(2⁺) channels: the complex thought. *Biochim Biophys Acta*, *1843*(10), 2322-2333. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.02.019
- Halm, S. T., Bottomley, M. A., Almutairi, M. M., Di Fulvio, M., & Halm, D. R. (2017). Survival and growth of C57BL/6J mice lacking the BK channel, Kcnma1: lower adult body weight occurs together with higher body fat. *Physiol Rep*, *5*(4). doi:10.14814/phy2.13137
- Hansen, R. S., Diness, T. G., Christ, T., Wettwer, E., Ravens, U., Olesen, S. P., & Grunnet, M. (2006). Biophysical characterization of the new human ether-a-go-go-related gene channel opener NS3623 [N-(4-bromo-2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl)-N'-(3'-trifluoromethylphenyl)urea]. *Mol Pharmacol*, *70*(4), 1319-1329. doi:10.1124/mol.106.026492
- Hille, B. (2001). *Ion channels of excitable membranes* (3rd ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer.
- Hite, R. K., Tao, X., & MacKinnon, R. (2017). Structural basis for gating the high-conductance Ca(2⁺)-activated K(+) channel. *Nature*, *541*(7635), 52-57. doi:10.1038/nature20775
- Horrigan, F. T., & Aldrich, R. W. (2002). Coupling between voltage sensor activation, Ca²⁺ binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels. *J Gen Physiol*, *120*(3), 267-305. doi:10.1085/jgp.20028605
- Hoshi, T., Wissuwa, B., Tian, Y., Tajima, N., Xu, R., Bauer, M., . . . Hou, S. (2013). Omega-3 fatty acids lower blood pressure by directly activating large-conductance Ca(2⁺)-dependent K(+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(12), 4816-4821. doi:10.1073/pnas.1221997110
- Hoshi, T., Xu, R., Hou, S., Heinemann, S. H., & Tian, Y. (2013). A point mutation in the human Slo1 channel that impairs its sensitivity to omega-3 docosahexaenoic acid. *J Gen Physiol*, *142*(5), 507-522. doi:10.1085/jgp.201311061
- Hou, S., Heinemann, S. H., & Hoshi, T. (2009). Modulation of BKCa channel gating by endogenous signaling molecules. *Physiology (Bethesda)*, *24*, 26-35. doi:10.1152/physiol.00032.2008

- Imlach, W. L., Finch, S. C., Miller, J. H., Meredith, A. L., & Dalziel, J. E. (2010). A role for BK channels in heart rate regulation in rodents. *PLoS One*, 5(1), e8698. doi:10.1371/journal.pone.0008698
- Jaggard, J. H., Porter, V. A., Lederer, W. J., & Nelson, M. T. (2000). Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278(2), C235-256. doi:10.1152/ajpcell.2000.278.2.C235
- Jessus, C., Munro, C., & Houlston, E. (2020). Managing the Oocyte Meiotic Arrest-Lessons from Frogs and Jellyfish. *Cells*, 9(5). doi:10.3390/cells9051150
- Jia, Z., Yazdani, M., Zhang, G., Cui, J., & Chen, J. (2018). Hydrophobic gating in BK channels. *Nat Commun*, 9(1), 3408. doi:10.1038/s41467-018-05970-3
- Lee, U. S., & Cui, J. (2010). BK channel activation: structural and functional insights. *Trends Neurosci*, 33(9), 415-423. doi:10.1016/j.tins.2010.06.004
- Lenaeus, M. J., Burdette, D., Wagner, T., Focia, P. J., & Gross, A. (2014). Structures of KcsA in complex with symmetrical quaternary ammonium compounds reveal a hydrophobic binding site. *Biochemistry*, 53(32), 5365-5373. doi:10.1021/bi500525s
- Li, W., & Aldrich, R. W. (2004). Unique inner pore properties of BK channels revealed by quaternary ammonium block. *J Gen Physiol*, 124(1), 43-57. doi:10.1085/jgp.200409067
- Li, W., & Aldrich, R. W. (2006). State-dependent block of BK channels by synthesized shaker ball peptides. *J Gen Physiol*, 128(4), 423-441. doi:10.1085/jgp.200609521
- Li, X., Poschmann, S., Chen, Q., Fazeli, W., Oundjian, N. J., Snoeijen-Schouwenaars, F. M., . . . Wang, Q. K. (2018). De novo BK channel variant causes epilepsy by affecting voltage gating but not Ca(2+) sensitivity. *Eur J Hum Genet*, 26(2), 220-229. doi:10.1038/s41431-017-0073-3
- Liang, L., Li, X., Moutton, S., Schrier Vergano, S. A., Cogne, B., Saint-Martin, A., . . . Wang, Q. K. (2019). De novo loss-of-function KCNMA1 variants are associated with a new multiple malformation syndrome and a broad spectrum of developmental and neurological phenotypes. *Hum Mol Genet*, 28(17), 2937-2951. doi:10.1093/hmg/ddz117
- Liu, G., Zakharov, S. I., Yang, L., Deng, S. X., Landry, D. W., Karlin, A., & Marx, S. O. (2008). Position and role of the BK channel alpha subunit S0 helix inferred from disulfide crosslinking. *J Gen Physiol*, 131(6), 537-548. doi:10.1085/jgp.200809968
- MacKinnon, R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature*, 350(6315), 232-235. doi:10.1038/350232a0
- Magleby, K. L. (2003). Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. *J Gen Physiol*, 121(2), 81-96. doi:10.1085/jgp.20028721
- McCoy, J. G., & Nimigean, C. M. (2012). Structural correlates of selectivity and inactivation in potassium channels. *Biochim Biophys Acta*, 1818(2), 272-285. doi:10.1016/j.bbamem.2011.09.007
- 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(10), 5562-5567. doi:10.1073/pnas.100118597
- Meredith, A. L., Thorneloe, K. S., Werner, M. E., Nelson, M. T., & Aldrich, R. W. (2004). Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J Biol Chem*, 279(35), 36746-36752. doi:10.1074/jbc.M405621200
- Montgomery, J. R., Whitt, J. P., Wright, B. N., Lai, M. H., & Meredith, A. L. (2013). Mis-expression of the BK K(+) channel disrupts suprachiasmatic nucleus circuit rhythmicity

- and alters clock-controlled behavior. *Am J Physiol Cell Physiol*, 304(4), C299-311. doi:10.1152/ajpcell.00302.2012
- Neelsen, L. C., Riel, E. B., Rinne, S., Schmid, F. R., Jurs, B. C., Bedoya, M., . . . Schewe, M. (2024). Ion occupancy of the selectivity filter controls opening of a cytoplasmic gate in the K(2P) channel TALK-2. *Nat Commun*, 15(1), 7545. doi:10.1038/s41467-024-51812-w
- Neher, E., & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554), 799-802. doi:10.1038/260799a0
- Niemeyer, M. I., Cid, L. P., Gonzalez, W., & Sepulveda, F. V. (2016). Gating, Regulation, and Structure in K2P K⁺ Channels: In Varietate Concordia? *Mol Pharmacol*, 90(3), 309-317. doi:10.1124/mol.116.103895
- Orio, P., & Latorre, R. (2005). Differential effects of beta 1 and beta 2 subunits on BK channel activity. *J Gen Physiol*, 125(4), 395-411. doi:10.1085/jgp.200409236
- 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. doi:10.1152/nips.01387.2002
- Rockman, M. E., Vouga, A. G., & Rothberg, B. S. (2020). Molecular mechanism of BK channel activation by the smooth muscle relaxant NS11021. *J Gen Physiol*, 152(6). doi:10.1085/jgp.201912506
- Romanenko, V., Nakamoto, T., Srivastava, A., Melvin, J. E., & Begenisich, T. (2006). Molecular identification and physiological roles of parotid acinar cell maxi-K channels. *J Biol Chem*, 281(38), 27964-27972. doi:10.1074/jbc.M603871200
- Roy, S., Morayo Akande, A., Large, R. J., Webb, T. I., Camarasu, C., Sergeant, G. P., . . . Hollywood, M. A. (2012). Structure-activity relationships of a novel group of large-conductance Ca(2+)-activated K(+) (BK) channel modulators: the GoSlo-SR family. *ChemMedChem*, 7(10), 1763-1769. doi:10.1002/cmdc.201200321
- Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C., & Wei, A. (2006). High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci*, 7(12), 921-931. doi:10.1038/nrn1992
- Sausbier, M., Hu, H., Arntz, C., Feil, S., Kamm, S., Adelsberger, H., . . . Ruth, P. (2004). Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca²⁺-activated K⁺ channel deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(25), 9474-9478. doi:10.1073/pnas.0401702101
- Schewe, M., Nematian-Ardestani, E., Sun, H., Musinszki, M., Cordeiro, S., Bucci, G., . . . Baukrowitz, T. (2016). A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K2P K(+) Channels. *Cell*, 164(5), 937-949. doi:10.1016/j.cell.2016.02.002
- Schewe, M., Sun, H., Mert, U., Mackenzie, A., Pike, A. C. W., Schulz, F., . . . Baukrowitz, T. (2019). A pharmacological master key mechanism that unlocks the selectivity filter gate in K(+) channels. *Science*, 363(6429), 875-880. doi:10.1126/science.aav0569
- Schreiber, M., & Salkoff, L. (1997). A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J*, 73(3), 1355-1363. doi:10.1016/S0006-3495(97)78168-2
- Smith, P. L., Baukrowitz, T., & Yellen, G. (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature*, 379(6568), 833-836. doi:10.1038/379833a0
- Swenson, R. P., & Armstrong, C. M. (1981). K⁺ channels close more slowly in the presence of external K⁺ and Rb⁺ *Nature* doi:10.1038/291427a0
- Tabarki, B., AlMajhad, N., AlHashem, A., Shaheen, R., & Alkuraya, F. S. (2016). Homozygous KCNMA1 mutation as a cause of cerebellar atrophy, developmental delay and seizures. *Hum Genet*, 135(11), 1295-1298. doi:10.1007/s00439-016-1726-y
- Tang, Q. Y., Zhang, Z., Xia, X. M., & Lingle, C. J. (2010). Block of mouse Slo1 and Slo3 K⁺ channels by CTX, IbTX, TEA, 4-AP and quinidine. *Channels (Austin)*, 4(1), 22-41. doi:10.4161/chan.4.1.10481

- Tang, X. D., Xu, R., Reynolds, M. F., Garcia, M. L., Heinemann, S. H., & Hoshi, T. (2003). Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels. *Nature*, *425*(6957), 531-535. doi:10.1038/nature02003
- Tao, X., Hite, R. K., & MacKinnon, R. (2017). Cryo-EM structure of the open high-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel. *Nature*, *541*(7635), 46-51. doi:10.1038/nature20608
- Tao, X., & MacKinnon, R. (2019). Molecular structures of the human Slo1 K+ channel in complex with β 4. *Elife*, *8*. doi:10.7554/eLife.51409
- Thompson, J., & Begenisich, T. (2012). Selectivity filter gating in large-conductance Ca(2+)-activated K+ channels. *J Gen Physiol*, *139*(3), 235-244. doi:10.1085/jgp.201110748
- Tian, Y., Aursnes, M., Hansen, T. V., Tungen, J. E., Galpin, J. D., Leisle, L., . . . Hoshi, T. (2016). Atomic determinants of BK channel activation by polyunsaturated fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(48), 13905-13910. doi:10.1073/pnas.1615562113
- Tricarico, D., & Mele, A. (2017). Commentary: A BK (Slo1) channel journey from molecule to physiology. *Front Pharmacol*, *8*, 188. doi:10.3389/fphar.2017.00188
- Valverde, M. A., Rojas, P., Amigo, J., Cosmelli, D., Orío, P., Bahamonde, M. I., . . . Latorre, R. (1999). Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science*, *285*(5435), 1929-1931. doi:10.1126/science.285.5435.1929
- Vandenberg, J. I., Perozo, E., & Allen, T. W. (2017). Towards a Structural View of Drug Binding to hERG K(+) Channels. *Trends Pharmacol Sci*, *38*(10), 899-907. doi:10.1016/j.tips.2017.06.004
- Villa, C., & Combi, R. (2016). Potassium Channels and Human Epileptic Phenotypes: An Updated Overview. *Front Cell Neurosci*, *10*, 81. doi:10.3389/fncel.2016.00081
- Villarroel, A., Alvarez, O., Oberhauser, A., & Latorre, R. (1988). Probing a Ca2+-activated K+ channel with quaternary ammonium ions. *Pflugers Arch*, *413*(2), 118-126. doi:10.1007/BF00582521
- 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*(25), 14922-14927. doi:10.1073/pnas.93.25.14922
- Webb, T. I., Kshatri, A. S., Large, R. J., Akande, A. M., Roy, S., Sergeant, G. P., . . . Hollywood, M. A. (2015). Molecular mechanisms underlying the effect of the novel BK channel opener GoSlo: involvement of the S4/S5 linker and the S6 segment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(7), 2064-2069. doi:10.1073/pnas.1400555112
- Werner, M. E., Zvara, P., Meredith, A. L., Aldrich, R. W., & Nelson, M. T. (2005). Erectile dysfunction in mice lacking the large-conductance calcium-activated potassium (BK) channel. *J Physiol*, *567*(Pt 2), 545-556. doi:10.1113/jphysiol.2005.093823
- Wilkens, C. M., & Aldrich, R. W. (2006). State-independent block of BK channels by an intracellular quaternary ammonium. *J Gen Physiol*, *128*(3), 347-364. doi:10.1085/jgp.200609579
- Xia, X.-M., Ding, J.-P., Zeng, X.-H., Duan, K.-L., & Lingle, C. J. (2000). Rectification and Rapid Activation at Low Ca2+ of Ca2+-Activated, Voltage-Dependent BK Currents: Consequences of Rapid Inactivation by a Novel β Subunit. *The Journal of Neuroscience*, *20*(13), 4890-4903. doi:10.1523/jneurosci.20-13-04890.2000
- Xia, X.-M., Ding, J. P., & Lingle, C. J. (1999). Molecular Basis for the Inactivation of Ca2+- and Voltage-Dependent BK Channels in Adrenal Chromaffin Cells and Rat Insulinoma Tumor Cells. *The Journal of Neuroscience*, *19*(13), 5255-5264. doi:10.1523/jneurosci.19-13-05255.1999

- Yang, H., Shi, J., Zhang, G., Yang, J., Delaloye, K., & Cui, J. (2008). Activation of Slo1 BK channels by Mg²⁺ coordinated between the voltage sensor and RCK1 domains. *Nat Struct Mol Biol*, *15*(11), 1152-1159. doi:10.1038/nsmb.1507
- Yang, H., Zhang, G., & Cui, J. (2015). BK channels: multiple sensors, one activation gate. *Front Physiol*, *6*, 29. doi:10.3389/fphys.2015.00029
- Yellen, G. (1984). Ionic permeation and blockade in Ca²⁺-activated K⁺ channels of bovine chromaffin cells. *J Gen Physiol*, *84*(2), 157-186. doi:10.1085/jgp.84.2.157
- Yesil, G., Aralasmak, A., Akyuz, E., Icagasioglu, D., Uygur Sahin, T., & Bayram, Y. (2018). Expanding the Phenotype of Homozygous KCNMA1 Mutations; Dyskinesia, Epilepsy, Intellectual Disability, Cerebellar and Corticospinal Tract Atrophy. *Balkan Med J*, *35*(4), 336-339. doi:10.4274/balkanmedj.2017.0986
- Yuan, P., Leonetti, M. D., Pico, A. R., Hsiung, Y., & MacKinnon, R. (2010). Structure of the human BK channel Ca²⁺-activation apparatus at 3.0 Å resolution. *Science*, *329*(5988), 182-186. doi:10.1126/science.1190414
- Zakharov, S. I., Morrow, J. P., Liu, G., Yang, L., & Marx, S. O. (2005). Activation of the BK (SLO1) potassium channel by mallotoxin. *J Biol Chem*, *280*(35), 30882-30887. doi:10.1074/jbc.M505302200
- Zang, K., Zhang, Y., Hu, J., & Wang, Y. (2018). The Large Conductance Calcium- and Voltage-activated Potassium Channel (BK) and Epilepsy. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, *17*(4), 248-254. doi:10.2174/1871527317666180404104055
- Zhou, J., Augelli-Szafran, C. E., Bradley, J. A., Chen, X., Koci, B. J., Volberg, W. A., . . . Cordes, J. S. (2005). Novel potent human ether-a-go-go-related gene (hERG) potassium channel enhancers and their in vitro antiarrhythmic activity. *Mol Pharmacol*, *68*(3), 876-884. doi:10.1124/mol.105.014035
- Zhou, Y., Xia, X. M., & Lingle, C. J. (2011). Cysteine scanning and modification reveal major differences between BK channels and Kv channels in the inner pore region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(29), 12161-12166. doi:10.1073/pnas.1104150108
- Zhou, Y., Xia, X. M., & Lingle, C. J. (2018). BK channel inhibition by strong extracellular acidification. *Elife*, *7*. doi:10.7554/eLife.38060
- Zhu, Y., Ye, P., Chen, S. L., & Zhang, D. M. (2018). Functional regulation of large conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in vascular diseases. *Metabolism*, *83*, 75-80. doi:10.1016/j.metabol.2018.01.008

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Baukrowitz bedanken, der mich mir die Durchführung der elektrophysiologischen Experimente und das Verfassen dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat. Vielen Dank für jegliche Unterstützung, interessante Gespräche, hilfreiche Ratschläge und kritische Anmerkungen.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Herrn Dr. Marcus Schewe, der mich stets bei allen Fragestellungen rund um die Durchführung von Experimenten, der statistischen Auswertung von Daten oder der Korrektur der Dissertationsschrift unterstützt hat.

Des Weiteren möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Thomas Baukrowitz danken. Dr. Marianne Musinszki, Dr. Sönke Cordeiro und Dr. Elena Riel danke ich für ihre konstruktiven Anregungen und Hilfestellungen. Für jegliche Unterstützung im Laboralltag, wie der Oozytenentnahme, der Herstellung von RNA oder Lösungen, sowie für gute Gespräche danke ich Dr. Hariolf Fritzenschaft, Sandra Grüssel, Michaela Unmack und Ria Neumann. Ein weiterer Dank gilt Kristin Rathje, die mich während der gesamten Zeit, ob bei der gleichzeitigen Durchführung der Experimente im Gemeinschaftslabor oder beim Verfassen der Dissertation, stets begleitet hat.

Zuletzt möchte ich meiner Familie meinen Dank aussprechen. Ihr unterstützt mich schon mein Leben lang unermüdlich bei all meinen Vorhaben. Danke dafür!

8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation, abgesehen von der Beratung durch meine wissenschaftlichen Betreuer Prof. Dr. Thomas Baukowitz und Dr. Marcus Schewe, nach Inhalt und Form selbstständig verfasst wurde. Die Dissertation ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Die Dissertation wurde weder im Ganzen, noch zum Teil einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht. Es wurde mir kein akademischer Grad entzogen.

22. März 2025

Datum

Freya Johanna Werkmeister