

# **Regulierung eines kalziumempfindlichen Kaliumkanals durch Proteinkinase C**

**Dissertation**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Andrea Wulf**  
aus Rendsburg

Würzburg, Juli 2001

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Herr Prof. Dr. Schwab

Gutachter: Herr Prof. Dr. Benz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

## EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Andrea Wulf, die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt zu haben und keine, außer den angegebenen Quellen oder Hilfsmitteln verwendet zu haben.

Würzburg, den 26.07.2001

## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Andrea Wulf, daß die vorliegende Dissertation in dieser oder ähnlicher Form weder in einem anderen Prüfungsverfahren vorlag noch vorliegt.

Würzburg, den 26.07.2001

## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Andrea Wulf, daß die vorliegende Dissertation den ersten Versuch von mir darstellt, den naturwissenschaftlichen Doktorgrad zu erwerben. Seit dem 13.02.1997 bin ich Inhaberin des akademischen Grades "Diplom-Biologin", verliehen von der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Würzburg, den 26.07.2001

## PUBLIKATIONSLISTE

### Originalarbeit:

- X. R. ZHU, A. WULF, M. SCHWARZ, D. ISBRANDT, O. PONGS (1999): Characterization of human Kv4.2 mediating a rapidly-inactivating transient voltage-sensitive K<sup>+</sup> Current. *Receptors and Channels* **6**: 387–400.
- A. SCHWAB, A. WULF, C. SCHULZ, J. REINHARDT, D. WEINHOLD, S. C. HEBERT, S. SILBERNAGL (2001): Subcellular distribution of Ca<sup>2+</sup> sensitive K<sup>+</sup> channels (IK1) in migrating cells. (eingereicht).
- A. WULF, A. SCHWAB (2001): Regulation of a Ca<sup>2+</sup> sensitive K<sup>+</sup> channel (cIK1) by protein kinase C. (eingereicht).

### Abstracts:

- A. WULF, A. SCHWAB (2001): Regulation of a Ca<sup>2+</sup> sensitive K<sup>+</sup> channel (cIK1) from MDCK cells by protein kinase C. *Pflügers Arch.* **441**: R 212.
- C. SCHULZ, J. REINHARDT, A. WULF, W. KESSLER, A. SCHWAB (2001): Sorting of Ca<sup>2+</sup> sensitive K<sup>+</sup> channels (hIK1) in migrating cells. *Pflügers Arch.* **441**: R 211.
- A. SCHWAB, C. SCHULZ, A. WULF, J. REINHARDT, D. WEINHOLD, S. C. HEBERT, S. SILBERNAGL (2000): Subcellular distribution of Ca<sup>2+</sup> sensitive K<sup>+</sup> channels (IK1) in migrating cells.
- A. SCHWAB, A. WULF, J. REINHARDT, C. SCHULZ, B. SCHURICHT, S. C. HEBERT, S. SILBERNAGL (2000): Cloning, regulation and subcellular localization of a Ca<sup>2+</sup> sensitive K<sup>+</sup> channel (cIK1) from migrating cells. *Pflügers Arch.* **439**: R 310.
- A. RÖLL, A. WULF, B. SCHURICHT, A. SCHWAB (2000): K<sup>+</sup> Channel (hIK1) dependent migration of human neutrophil granulocytes. *Pflügers Arch.* **439**: R 447.
- D. WEINHOLD, B. SCHURICHT, A. WULF, A. SCHWAB (2000): Distribution of an apical potassium channel (ROMK2) in migrating renal epithelial cells. *Pflügers Arch.* **439**: R 381.
- D. WEINHOLD, B. SCHURICHT, A. WULF, A. SCHWAB (1999): Stable transfection of an apical potassium channel (ROMK2) in migrating renal epithelial cells. *Kidney Blood Pressure Res.* **22**: 201.

## LEBENS LAUF

**ANDREA WULF** geboren am 11. März 1964 in Rendsburg

### **SCHULAU SBILDUNG:**

1970 - 1974 Grunds chule Rendsburg  
08/74 – 01/84 Helene-Lange-Gymnasium Rendsburg - Fachhochschulreife  
02/88 – 12/89 Städtisches Abendgymnasium Kiel - Abitur

### **BERUFS AU SBILDUNG, BERUFS PRAXIS:**

09/84 – 02/87 Ausbildung bei der Standortverwaltung Rendsburg zur  
Verwaltungsfachangestellten  
02/87 – 10/90 Sachbearbeiterin im Lufttransportgeschwader 63 Hohn

### **HOCHSCHULSTUDIUM:**

10/90 – 11/95 Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Vordiplom: 27.10.1992  
Diplom: 13.02.1997  
11/95 – 02/97 Diplomarbeit am Zoologischen Institut der Christian-  
Albrechts-Universität zu Kiel: "Elektrophysiologische  
Untersuchungen zum Einfluß der Temperatur auf  
Neurone des Cerebralganglions von Pulmonaten"  
10/97 – 12/98 Aufbaustudium Molekularbiologie, Universität Hamburg

### **Wissenschaftliche Tätigkeiten:**

09/97 – 12/98 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Neurale  
Signalverarbeitung am Zentrum für Molekulare  
Neurobiologie Hamburg  
01/99 – 09/01 Dissertation am Physiologischen Institut der Universität  
Würzburg: "Regulation eines kalziumempfindlichen  
Kaliumkanals durch Proteinkinase C"

Würzburg, den 26.07.2001

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Ionenkanäle	1
1.2	Kaliumkanäle	2
1.3	Ca <sup>2+</sup> -empfindliche K <sup>+</sup> -Kanäle	4
1.4	Ca <sup>2+</sup> -empfindliche K <sup>+</sup> -Kanäle mittlerer Leitfähigkeit	6
1.5	Regulierung Ca <sup>2+</sup> -empfindlicher K <sup>+</sup> -Kanäle durch Proteinkinasen	8
1.6	Zielsetzung	9
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>11</b>
2.1.1	Chemikalien	11
2.1.2	Geräte	11
2.1.3	Puffer, Lösungen, Medien	13
2.1.4	Oligonukleotide	18
2.1.5	Vektoren	18
2.1.6	Zelllinien und Bakterien	19
2.1.7	Software	19
<b>2.2</b>	<b>DNA-Techniken</b>	<b>20</b>
2.2.1	Transformation kompetenter Bakterien	20

2.2.2	Plasmid-Isolierung	20
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion	21
2.2.4	PCR zum Nachweis transformierter Bakterienkolonien	22
2.2.5	Zielgerichtete Mutagenese	22
2.2.6	Restriktionsverdau von DNA	24
2.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten	24
2.2.8	Gelelektrophorese von DNA	24
2.2.9	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	25
2.2.10	Konzentrationsbestimmung von DNA	25
2.2.11	DNA-Extraktion und -Präzipitation	26
2.2.12	DNA-Sequenzierung	26
<b>2.3</b>	<b>Arbeiten auf zellulärer Ebene</b>	<b>26</b>
2.3.1	Langzeitlagerung und Routinehaltung von Zellen	27
2.3.2	Aussaat von Zellen für die Elektrophysiologie	28
2.3.3	Transiente Transfektion	28
2.3.4	Stabile Transfektion	29
<b>2.4</b>	<b>Elektrophysiologische Methoden</b>	<b>30</b>
2.4.1	Theorie der Patch-Clamp-Technik	30
2.4.2	Meßanordnungen	31
2.4.3	Meßplatz	32
2.4.4	Pipettenpräparation	34
2.4.5	Datenerfassung und Analyse	35
2.4.6	Pulsprotokolle	36
2.4.7	Statistik	38
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Strukturanalyse</b>	<b>40</b>
3.1.1	Proteinsequenzvergleich und Sequenzanalyse	40
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung des Expressionssystems</b>	<b>42</b>

---

3.2.1	Heterologe Expression von cIK1-Kanälen	42
<b>3.3</b>	<b>Elektrophysiologische Charakterisierung von cIK1-Strömen</b>	<b>44</b>
3.3.1	Untersuchungen zur Kaliumselektivität	44
3.3.2	Abhängigkeit von der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration	46
3.3.3	Pharmakologische Charakterisierung	47
<b>3.4</b>	<b>Untersuchungen zur Phosphorylierung</b>	<b>52</b>
3.4.1	Regulierung durch die Proteinkinase A (PKA)	52
3.4.2	Regulierung des cIK1 durch die Proteinkinase C (PKC)	54
3.4.3	Hemmbarkeit ATP-induzierten Stroms	56
3.4.4	Aktivierung der PKC	58
3.4.5	Langzeitstimulierung mit Phorbolestern	59
<b>3.5</b>	<b>Mutation der PKC-Phosphorylierungsstellen</b>	<b>62</b>
3.5.1	Untersuchung der Mutanten auf Funktionalität	62
3.5.2	Regulierung durch die Proteinkinase C	64
3.5.3	Hemmbarkeit ATP-induzierten Stroms	66
3.5.4	Aktivierung der PKC	68
3.5.5	Langzeitstimulierung mit Phorbolestern	70
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
4.1	Vergleich des klonierten cIK1 mit IK1-Kanälen anderer Spezies	74
4.2	Vergleich des klonierten cIK1 mit dem nativen cIK1	76
4.3	Regulierung der IK1-Kanäle durch die Proteinkinase A	77
4.4	Regulierung der IK1-Kanäle durch die Proteinkinase C	79
4.5	Einfluß der Mutationen auf die Kanalaktivität	81
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>84</b>
	<b>Summary</b>	<b>86</b>

<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>88</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>99</b>
7.1	Aminosäuresequenz des cIK1	99
7.2	Vergleich der Aminosäuresequenz von IK1-Kanälen	100
7.3	Abkürzungen	101
7.4	Danksagungen	103

# 1. Einleitung

## 1.1 Ionenkanäle

Die Zellmembran bildet eine selektive Barriere zwischen dem cytoplasmatischen Zellkompartiment und dem Extrazellulärraum. Sie dient der Aufrechterhaltung des intrazellulären Milieus und ermöglicht einen gerichteten Austausch von Ionen, niedermolekularen Substanzen und Makromolekülen. In Bezug auf die Ionenkonzentration bestehen große Unterschiede in der Zusammensetzung des intrazellulären und extrazellulären Milieus. Diese Gradienten der Ionenkonzentrationen und die relative Permeabilität der Membran für bestimmte Ionen ermöglichen die Entstehung eines Membranpotentials. Neben Poren, Pumpen und Carriern bilden Ionenkanäle einen Typ integraler Membranproteine, die den Transport von Ionen vermitteln. Sie sind meist selektiv für bestimmte Ionen und lassen diese entsprechend ihres elektrochemischen Gradienten die Zellmembran passieren. Das Öffnen und Schließen der Kanäle wird durch die Änderung des Membranpotentials oder die Bindung intra- oder extrazellulärer Liganden oder Botenstoffe bewirkt. Ionenkanäle weisen Durchflußraten von mehr als  $10^6$  Ionen pro Sekunde auf und können so das Membranpotential in kürzester Zeit lokal verändern. Für die Funktion von Zellen spielen insbesondere  $\text{Na}^{+-}$ ,  $\text{K}^{+-}$ ,  $\text{Ca}^{2+-}$  und  $\text{Cl}^{-}$ -Kanäle eine entscheidende Rolle (Hille, 1992).

---

## 1.2 Kaliumkanäle

Unter den Ionenkanälen bilden die K<sup>+</sup>-selektiven Kanäle die weitaus größte Gruppe mit einem entsprechend breiten funktionellen Spektrum. Entwicklungsgeschichtlich sind sie eine sehr alte Proteinfamilie. Für K<sup>+</sup>-Kanäle kodierende Gene können in den Genomen fast aller Organismen wie z.B. in Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Invertebraten und Vertebraten nachgewiesen werden (Jan und Jan, 1997). Sie werden in nahezu allen erregbaren und nicht-erregbaren Zellen exprimiert, wo sie an einer Vielzahl lebenswichtiger Prozesse beteiligt sind. Zu ihren Aufgaben gehören u.a. die Kontrolle des Membranpotentials, die Regulierung der Sekretion von Hormonen und die Steuerung von Salz- und Wassertransport in Epithelien. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation, der Steuerung der Herzmuskelkontraktion und der Weiterleitung neuraler Signale.

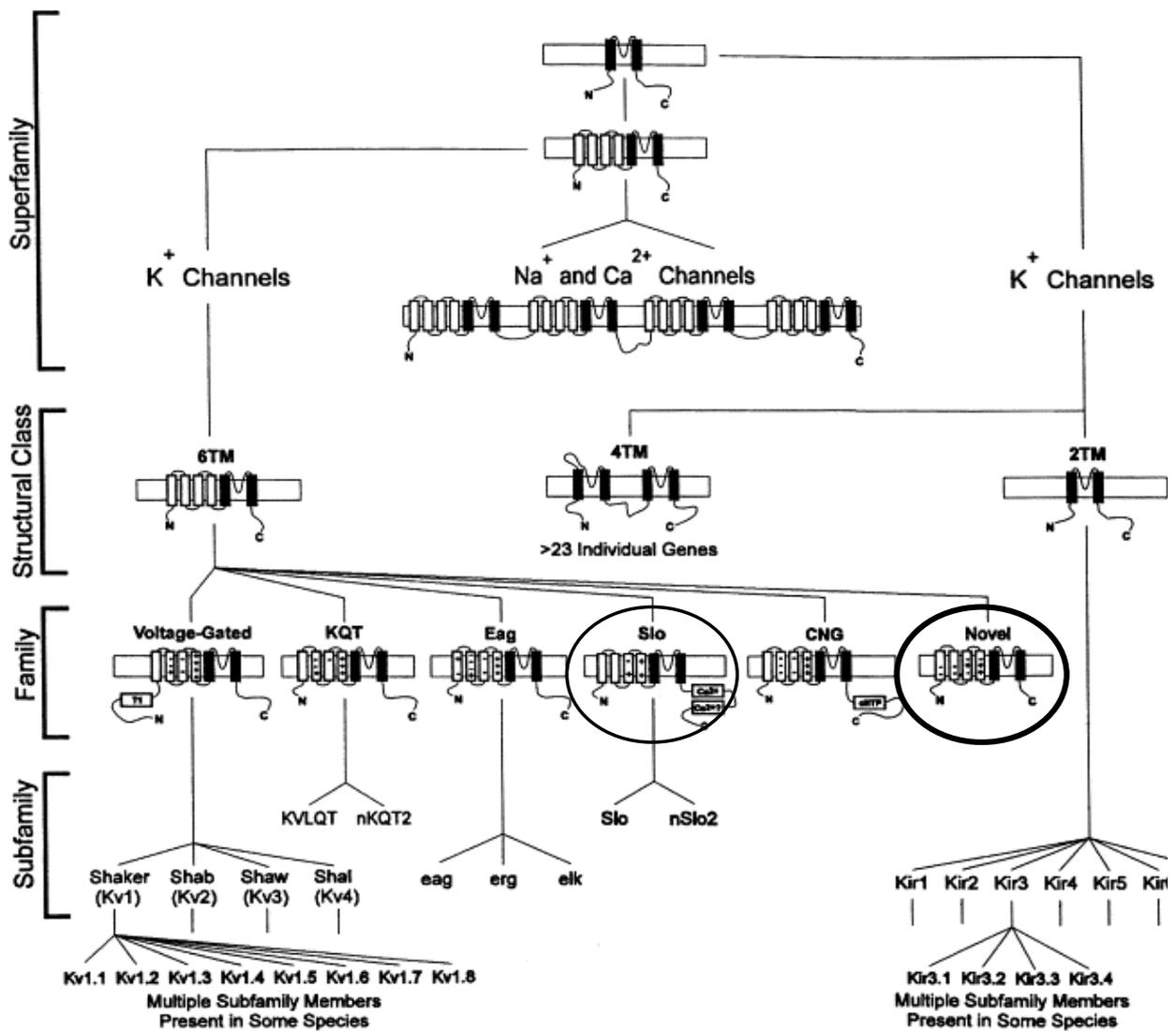
K<sup>+</sup>-Kanäle werden durch unterschiedliche Steuerungsmechanismen reguliert. Bei den spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen bewirkt die Depolarisierung der Zellmembran eine Konformationsänderung des Kanalproteins und ermöglicht so ein Öffnen der Pore. Außerdem werden K<sup>+</sup>-Kanäle durch die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, zyklische Nukleotide, das ATP/ADP Verhältnis der Zelle, den pH-Wert oder mechanische Belastung aktiviert. Weiterhin wird die Aktivität dieser Kanäle mittels Phosphorylierung durch Proteinkinasen oder Dephosphorylierung durch Phosphatasen moduliert (Pongs, 1999).

K<sup>+</sup>-Kanäle bilden die eine außerordentlich heterogene Gruppe, die man aufgrund ihrer Struktur mit zwei, vier, sechs oder acht Untereinheiten in Klassen unterteilt (Abb.1) (Wei et al., 1996). Aus tierischen Organismen isolierte K<sup>+</sup>-Kanäle bestehen aus mehreren  $\alpha$ -Untereinheiten, die gemeinsam die Pore des Kanals bilden. Die Porenregion aller K<sup>+</sup>-Kanäle umfaßt ca. 20 hochkonservierte Aminosäuren und enthält ein charakteristisches Sequenzmotiv, die sog. Signatursequenz (GYGD), die den Selektivitätsfilter der Porenregion darstellt (Heginbotham et al., 1992; Yang et al., 1996; Doyle et al., 1998; Aqvist et al. 2000).

Eukaryontische K<sup>+</sup>-Kanäle innerhalb einer Strukturklasse werden aufgrund ihrer Membrantopologie, Funktionalität und verschiedener charakteristischer

Aminosäuresequenzmotive in Familien eingeteilt. Vergleiche der Aminosäuresequenz haben gezeigt, daß die Mitglieder einer Kanalfamilie verschiedener Organismen einander ähnlicher sind als die Mitglieder verschiedener K<sup>+</sup>-Kanalfamilien eines Organismus.

Die Klasse der Kanäle mit sechs transmembranspannenden Segmenten umfaßt eine Reihe sehr unterschiedlicher K<sup>+</sup>-Kanäle, die zum größten Teil auswärtsrektifizierend sind. Zur Klasse dieser Kanäle, die in sechs Familien unterteilt ist, gehören u.a. die spannungsabhängigen Kv- (voltage-dependent K<sup>+</sup>-channels) und die Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sub>Ca</sub>-Kanäle (calcium-dependent K<sup>+</sup>-channels) (Chandy und Gutman, 1995; Jan und Jan, 1997).



**Abb.1: Übersichtsschema über die hierarchische Klassifizierung von K<sup>+</sup>-Kanälen**

(aus Wei et. al., 1996) (Erläuterungen siehe Text). Die markierten K<sup>+</sup>-Kanalfamilien "Slo" und "Novel" repräsentieren die Ca<sup>2+</sup>-empfindlichen K<sup>+</sup>-Kanäle

### 1.3 $\text{Ca}^{2+}$ -empfindliche $\text{K}^+$ -Kanäle

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen  $\text{K}^+$ -Kanäle werden durch einen Anstieg der freien intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aktiviert. Die Aktivität dieser Kanäle spielt eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Prozessen, die mit einer Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und einer damit verbundenen Änderung des Membranpotentials einhergehen.  $\text{Ca}^{2+}$  erfüllt zahlreiche wichtige Funktionen als "second messenger" bei der intrazellulären Signalübertragung hormoneller Stimuli und als Aktivator einiger Enzyme z.B. bei der Muskelkontraktion. Entsprechend der Vielfalt der Funktionen des  $\text{Ca}^{2+}$  findet man diese Kanäle in nahezu allen Geweben mehrzelliger Organismen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen  $\text{K}^+$ -Kanäle werden aufgrund ihrer Einzelkanalleitfähigkeiten in drei Unterfamilien gegliedert, die BK-, SK- und IK-Kanäle (Big, Small, Intermediate). Neben ihren unterschiedlichen elektrophysiologischen Eigenschaften unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz, ihrer Struktur und ihrer pharmakologischen Eigenschaften. Sie werden in verschiedenen Geweben exprimiert, wo sie entsprechend ihrer typischen Charakteristiken unterschiedliche Funktionen erfüllen (Vergara, 1997).

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle großer Leitfähigkeit (BK-Kanäle) weisen eine Einzelkanalleitfähigkeit von ca. 250 pS auf. Sie werden überwiegend in glatten Muskelzellen und Neuronen, kolokalisiert mit spannungsaktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, exprimiert (Robitaille et al., 1993, Mori et al., 2000). BK-Kanäle werden ähnlich wie die spannungsabhängigen Kv-Kanäle auch durch eine Depolarisierung der Zellmembran aktiviert. Allerdings ist ihre Spannungsabhängigkeit weit zu positiven Membranpotentialen. Zusätzlich zur spannungsabhängigen Strukturänderung benötigen sie  $\text{Ca}^{2+}$  zur Aktivierung. Diese Eigenschaften begründen ihre Funktion als Rückkopplungsregulator der Aktivität von spannungsaktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen.

Die BK-Kanäle zeigen viele der typischen Strukturmerkmale der Kv-Kanäle. Die Topologie dieser Kanäle weist im Gegensatz zu allen bisher klonierten  $\text{K}^+$ -Kanälen die Besonderheit auf, daß sie um mindestens ein weiteres membrandurchspannendes Segment erweitert ist. Im Gegensatz zu allen anderen  $\text{K}^+$ -Kanälen liegt das aminoterminal Ende im extrazellulären Bereich (Meera et al., 1997).

---

Die Kanalaktivität der BK-Kanäle, ihre kinetischen Eigenschaften und  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität wird in starkem Ausmaß durch eine membranständige  $\beta$ -Untereinheit beeinflusst. Außerdem wurde beschrieben, daß sowohl die Spannungsabhängigkeit als auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit der BK-Kanäle durch Proteinkinasen moduliert werden (Reinhart et al. 1995). Pharmakologisch lassen sich die BK-Kanäle durch Charbydotoxin und Iberitoxin blockieren.

Im Gegensatz zu den BK-Kanälen haben die SK-Kanäle eine Einzelkanalleitfähigkeit von nur 4 - 14 pS. Sie sind spannungsunabhängig und werden bei submikromolaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (600 - 700 nmol/l) aktiviert (Xia et al., 1998). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte Aktivierung der Kanäle geht mit einer konstitutiven Bindung von Calmodulin am proximalen C-Terminus aller vier  $\alpha$ -Untereinheiten des Kanals einher (Keene et al., 1999; Schumacher et al., 2001).

Die SK-Kanäle werden überwiegend in erregbaren Zellen exprimiert. In Neuronen bewirkt der durch ein Aktionspotential ausgelöste Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Aktivierung der SK-Kanäle. Die durch das Öffnen der SK-Kanäle ausgelöste Membranhyperpolarisierung, die sog. langsame Nachhyperpolarisation (AHP), begrenzt in Neuronen die Frequenz der Aktionspotentiale (Köhler et al., 1996).

Die Topologie der SK-Kanäle entspricht mit sechs Transmembransegmenten, einer Porenregion und intrazellulären N- und C-Termini pro Untereinheit denen der Kv- und BK-Kanäle. Die Aminosäuresequenz aller bisher klonierten Mitglieder der SK-Kanalfamilie (SK1 - SK3) unterscheidet sich mit Ausnahme der Porenregion jedoch deutlich von derjenigen der Kv-Kanäle. Pharmakologisch lassen sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen  $\text{K}^+$ -Kanäle geringer Leitfähigkeit durch Apamin blockieren.

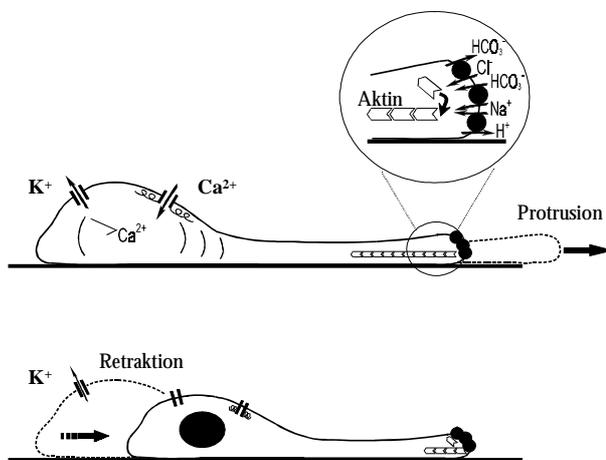
## 1.4 $\text{Ca}^{2+}$ -empfindliche $\text{K}^+$ -Kanäle mittlerer Leitfähigkeit

Die erste Beschreibung der funktionellen Eigenschaften eines  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen  $\text{K}^+$ -Kanals mittlerer Leitfähigkeit erfolgte bereits 1958 (Gardos G., 1958). Der in der Membran roter Blutkörperchen nachgewiesene  $\text{K}^+$ -selektive "Gardos-Kanal" konnte später aufgrund seiner elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften als Mitglied der IK-Kanalfamilie identifiziert werden (Szbeni et al., 1981; Pellegrino et al., 1989; Orringer et al., 1991; Brugnara et al., 1993). Die ersten Klonierungen dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven  $\text{K}^+$ -Kanals mittlerer Leitfähigkeit (IK1) erfolgten jedoch erst 1997 (Ishii et al., 1997; Joiner et al., 1997).

Die IK1-Kanäle weisen zu den SK-Kanälen eine 40-50%ige Sequenzhomologie auf. Mit sechs Transmembransegmenten, einer Porenregion und einem putativ intrazellulär gelegenen C- und N-Terminus sind sie auch hinsichtlich ihrer Struktur eng mit den SK-Kanälen verwandt. Wie diese öffnen die IK1-Kanäle spannungsunabhängig und werden durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im physiologischen Bereich aktiviert. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wurden sie ursprünglich der Subfamilie der SK-Kanäle zugeordnet. Anhand der bis heute nicht einheitlich geregelten Nomenklatur - IK1-Kanäle werden auch als SK4 KCa4 bzw. KCNN4 bezeichnet - wird deutlich, daß diese Kanäle ursprünglich als viertes Mitglied der SK-Kanalfamilie bewertet wurden. Hinsichtlich ihrer Verteilung und ihrer elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften weisen die IK1-Kanäle jedoch Unterschiede zu den SK-Kanälen auf, die deutlich machen, daß diese Kanäle eine eigenständige Subfamilie repräsentieren.

Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen Kanäle werden der IK1-Kanäle nicht in erregbaren Zellen exprimiert (Jensen et al., 1998; 1999). IK1-Kanäle konnten u.a. in den sekretorischen Epithelien der Lunge, der Placenta, des Colons und des Magens nachgewiesen werden, wo sie an der epithelialen Salz- und Wassersekretion beteiligt sind. Die Aktivierung der Kanäle führt zu einer Hyperpolarisation der basolateralen Membran dieser Zellen, die die  $\text{Ca}^{2+}$  und cAMP regulierte  $\text{Cl}^-$ -Sekretion erleichtert (Devor et al., 1996; 1997). Desweiteren werden sie in Erythroblasten (Vandorpe et al., 1998;) und Lymphocyten (Ghanshani et al., 2000) exprimiert, wo sie für die Reifung und Proliferation dieser Zellen erforderlich sind. Ihre Aktivität stabilisiert das

Membranpotential und erzeugt die elektrische Triebkraft für einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (Logsdon et al., 1997). In Fibroblasten und Melanomzellen wird ihre Funktion an der für die Zellwanderung (Migration) notwendigen Volumenregulierung diskutiert (Schwab, 2000). Untersuchungen an migrierenden Nierenepithelzellen (MDCK-F-Zellen) haben gezeigt, daß die Migration in starkem Maße von der Aktivität eines  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen  $\text{K}^+$ -Kanals mittlerer Leitfähigkeit (cIK1) abhängt (Schwab et al., 1994). Mit ihrer Fähigkeit zur Migration und zum Wachstum ohne Kontaktinhibition haben transformierte MDCK-F-Zellen ähnliche Eigenschaften wie Karzinomzellen (Schramek et al., 1997). Die Fähigkeit zur Migration setzt eine morphologische und funktionelle Polarisierung von Ionenkanälen und Transportern in der Ebene der Bewegungsrichtung in diesen Zellen voraus (Reinhardt et al., 1998; Schwab, 2001). In MDCK-F-Zellen reguliert der cIK1 u.a. die für die Migration notwendige Volumenabnahme am hinteren Zellpol und ermöglicht damit die Retraktion des Zellkörpers (Schwab et al., 1997;1996; 1995) (Abb.2).



**Abb.2: Schematisches Modell einer migrierenden Zelle**

modifiziert nach Schwab et al., 2001 (Erläuterungen siehe Text)

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen  $\text{K}^+$ -Kanäle mittlerer Leitfähigkeit haben eine Einzelkanalleitfähigkeit von 20 - 70 pS. In äquimolaren  $\text{K}^+$ -Konzentrationen sind die Ströme dieser Kanäle schwach einwärtsrektifizierend und zeigen im physiologischen Bereich keine Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik. Im Gegensatz zu SK-Kanälen

---

werden sie bereits bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von 100-300 nmol/l aktiviert. Die Aminosäuresequenz der IK1-Kanäle weist keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen auf. Es konnte gezeigt werden, daß eine Interaktion von Calmodulin mit dem Kanalprotein am proximalen C-Terminus des Kanals erfolgt und die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung der IK1-Kanäle ermöglicht (Fanger et al., 1999; Khanna et al, 1999). Pharmakologisch lassen sich die IK1-Kanäle durch Charybdotoxin und Clotrimazol blockieren. Sie sind jedoch insensitive gegenüber Apamin und Iberiotoxin. Die IK1-Kanäle lassen sich durch den spezifischen Aktviator 1-Ethyl-2-Benzimidazolone (1-EBIO) aktivieren (Rauer et al., 2000; Pedersen et al., 1999).

1999 wurde ein  $\text{Ca}^{2+}$  empfindlicher  $\text{K}^{+}$ -Kanal mittlerer Leitfähigkeit aus transformierter Nierenepithelzellen des Hundes (MDCK-F- Zellen) kloniert (Schwab et al., 2001). Die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften des nativen cIK1 in MDCK-Zellen entsprechen weitgehend denen anderer Isoformen bisher charakterisierter IK1-Kanäle (Schwab et al., 1993; 1994). Hinsichtlich seiner  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit weist der native  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Kanal jedoch große Unterschiede gegenüber anderen Isoformen der IK1-Kanalfamilie auf. In fusionierten MDCK-Zellen erfolgte seine halbmaximale Aktivierung erst bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von  $>100 \mu\text{mol/l}$ . Es konnte gezeigt werden, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit des nativen cIK1 maßgeblich unter dem Einfluß der Proteinkinase C (PKC) steht und eine Stimulierung der PKC zu einer 1000-fachen Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität führt (Schwab et al., 1993).

## 1.4 Regulierung von IK1-Kanälen durch Phosphorylierung

Neben der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration modulieren Phosphorylierungsreaktionen die Aktivität der IK1-Kanäle. Alle IK1-Kanäle enthalten zahlreiche Konsensussequenzen für eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC), die cAMP-oder cGMP-abhängige Proteinkinase (PKA) und die Caseinkinase II. Obwohl viele an IK1-Kanälen durchgeführte Untersuchungen auf ihre Regulierung durch Proteinkinasen hinweisen, konnte bisher jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob eine direkte Phosphorylierung der Kanalproteine deren Aktivität verändert.

---

Untersuchungen sowohl an klonierten als auch an nativen hIK1-Kanälen haben gezeigt, daß eine Erhöhung der intrazellulären ATP-Konzentration einen Anstieg der Kanalaktivität induziert (Gerlach et al., 2001; Pena et al., 2000). Die Aktivierung dieser Kanäle durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels bei gleichzeitiger Hemmung der Phosphodiesterase deuten auf eine PKA-abhängige Regulierung der Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität hin. Ein weiteres Indiz für eine Modulierung der Kanalaktivität durch die PKA ist die bei einigen Untersuchungen beobachtete Hemmbarkeit ATP-induzierter Ströme durch spezifische PKA-Inhibitoren oder Phosphatasen (Kamatsu et al., 1996; Pellegrino und Pellegrini, 1998).

Diesen Ergebnissen widersprechen jedoch andere Untersuchungen an heterolog exprimierten IK1-Kanalisoformen. Diese Experimente zeigten, daß die ATP-abhängige Regulierung der Kanäle unabhängig von einer Phosphorylierung ist (Gerlach et al., 2000; Schroder et al., 2000). Eine Erhöhung der intrazellulären ATP-Konzentration induzierte einen Anstieg der Kanalaktivität auch in Abwesenheit von Magnesium (Shindo et al., 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, daß die ATP-induzierte Kanalaktivität sich nicht durch Phosphatasen oder PKA-Inhibitoren hemmen ließ (Gerlach et al., 2001).

Die Aminosäuresequenz des cIK1 enthält im Gegensatz zu allen anderen klonierten IK1-Isoformen keine Konsensussequenz für eine PKA-Phosphorylierung. Die Möglichkeit einer Phosphorylierung des Kanalproteins besteht beim cIK1 an nur drei Bindungsstellen für die PKC. Im Gegensatz dazu finden sich bei den anderen IK1-Kanälen weitere nicht konservierte PKC-Phosphorylierungsstellen (Mensch 4, Ratte 4, Maus 5). Aufgrund der geringeren Anzahl der Konsensussequenzen für eine Phosphorylierung und der im Vergleich zu anderen IK1-Kanälen deutlich geringeren Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität des nativen cIK1 sollte eine Untersuchung der Regulierung des cIK1 Aufschluß darüber geben, ob eine PKC-Phosphorylierung die Kanalaktivität moduliert.

## 1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des aus MDCK-Zellen klonierten  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven  $\text{K}^+$ -Kanals mittlerer Leitfähigkeit (cIK1) und die Untersuchung seiner Regulierung durch die Proteinkinase C.

Zum Nachweis der erfolgreichen Klonierung sollte der Kanal heterolog in CHO und HEK293-Zellen exprimiert und mit der Patch-Clamp-Technik hinsichtlich seiner elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften untersucht werden. Im Vordergrund dieser Experimente stand der Vergleich der Eigenschaften des klonierten Kanals mit dem nativen in MDCK-Zellen exprimierten  $\text{K}^+$ -Kanal und IK1-Kanälen anderer Spezies.

Desweiteren sollte untersucht werden, ob eine Modulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit des cIK1 aufgrund einer möglichen Phosphorylierung durch die Proteinkinasen A oder C erfolgt. Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen dieser Regulierung sollten die drei putativen Konsensussequenzen für die PKC mittels zielgerichteter Mutagenese so verändert werden, daß eine direkte Phosphorylierung des Kanalprotein nicht mehr erfolgen konnte. Diese Experimente sollten klären, ob die PKC-abhängige Regulierung durch eine direkte Phosphorylierung des Kanalproteins an einer einzelnen Bindungsstelle erfolgt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Chemikalien**

Die Chemikalien wurden von den Firmen BOEHRINGER MANNHEIM, GIBCO BRL™, MERCK, MWG BIOTECH, PAA LABORATORIES GMBH, PHARMACIA BIOTECH, QUIAGEN und SIGMA bezogen. Die Bezugsquelle wird im folgenden gesondert erwähnt, wenn ein Einfluß auf die Versuchsdurchführung denkbar ist oder sich das Verständnis des Versuchsprotokolls vereinfacht.

#### **2.1.2 Geräte**

BIOMETRA, GÖTTINGEN, DEUTSCHLAND:

Thermocycler

Transilluminator

CONSORT, TURNHOUT, BELGIEN:

Spannungsgeber Modell E 431 und E 831; Micorcomputer Electrophoresis Power Supply

EPPENDORF, HAMBURG, DEUTSCHLAND:

Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1 ml, 2 ml

Thermomixer5437

FALCON BECTON DICKINSON LABWARE, FRANKLIN LAKES, NJ, USA:

96- und 6-well Kulturschalen

Petrischalen

Zellkulturflaschen

15 und 45 ml Falcon-Röhrchen

FÖHR MEDICAL INSTRUMENTS GMBH, POHLHEIM, DEUTSCHLAND:

Elektrodenziehgerät

HERAEUS GMBH, HANAU, DEUTSCHLAND:

Heraeus Laminarflow

Tischzentrifugen Biofuge

Begasungsbrutschrank

Variofuge RF

HEIDOLPH ELEKTRO KG, KELHEIM, DEUTSCHLAND:

Schüttelinkubator Unimax1010

IKA-WORKS INC., WILMINGTON, USA:

Vortex

Thermorührer

INSTRUTECH CORPORATION, LONG ISLAND, NY, USA:

IITC16 Computer Interface

KSG, OLCHING, DEUTSCHLAND:

Sterilisationsautoklav

KYROS SAFE GMBH, HAMBURG, DEUTSCHLAND:

Tiefkühl-Lagertruhe

LIST MEDICAL, DARMSTADT, DEUTSCHLAND:

EPC7 Patch-Clamp Verstärker

SHARP ELECTRONICS GMBH, HAMBURG:

Mikrowellengerät R-211

SIEMENS, HAMBURG, DEUTSCHLAND:

Kühlschrank

Gefrierschrank

TAYLOR-WHARTON, THEODORE, KANADA:

Stickstofftank

ZEISS, OBERKOCHEN, DEUTSCHLAND:

WTW, WEILHEIM, DEUTSCHLAND:

pH-Meter

Wasserbäder

Mikromanipulator

Binokular

Quecksilberbogenlampe

inverses Mikroskop IM35

UV-Photometer

### 2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

EDTA-Lösung	0,54	mmol/l	EDTA in PBS
Ethidiumbromid	10	mg/ml	Ethidiumbromid in Aqua bidest
DMEM/ HAM F12	Dullbecco´s MEM/Nutient Mix, pH 7,3		
	ergänzt durch:		
	3,57	g/l	HEPES, pH 7,3
	10	µg/l	epidermal growth factor (EGF) der Maus
	36	µg/l	Hydrocortison
	5	mg/l	(humanes Apo-) Transferrin
	5	mg/l	(bovines) Insulin
	5	µg/l	Na <sub>2</sub> SeO <sub>2</sub>
	1,1	g/l	NaHCO <sub>3</sub>
	50	U/ml	Penicillin/Streptomycin
	10	% (v/v)	FCS

---

LB-Medium	10	g/l	Caseinhydrolysat	
	10	g/l	NaCl	
	5	g/l	Hefeextrakt	
	1	ml/l	1N NaOH	autoklaviert
LB/Amp-Medium	100	mg/l	Ampicillin in LB-Medium	
LB/Amp-Platten	1	l	LB-Medium	
	15	g/l	Bacto-Agar	autoklaviert
	100	mg/l	Ampicillin	
LB/Kanamycin-Medium	70	mg/l	Kanamycin in LB-Medium	
LB/Kanamycin-Platten	1	l	LB-Medium	
	15	g/l	Bacto-Agar	autoklaviert
	70	mg/l	Kanamycin	
Ligationspuffer (10x) <i>(DNA-Ligation)</i>	200	mmol/l	Tris/HCl, pH 7,9	
	100	mmol/l	MgCl <sub>2</sub>	
	100	mmol/l	Dithiotreitol (DTT)	
	6	mmol/l	ATP	
MEM Alpha Medium	Minimal Essentiell Medium mit Earls's Salzen (mit Nukleotiden, L-Glutamin) ergänzt durch:			
	50	U/ml	Penicillin/Streptomycin	
	10	% (v/v)	FCS	

---

OPTI-MEM I	Serumreduziertes Medium (Modifizierung von MEM mit L-Glutamin, HEPES, 2,4 g/l Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , Natriumpyruvat, Hypoxanthin, Thymidin Spurenelementen, Wachstumsfaktoren, 1,1 mg/l Phenolrot)		
PBS	Phosphat bufferd saline, pH 7,4		
	141	mmol/l	NaCl
	0,4	mmol/l	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1,6	mmol/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	4	mmol/l	KCl
	1	mmol/l	MgCl <sub>2</sub>
PCR-Puffer (10x)	100	mmol/l	Tris-HCl, pH 9,0
	500	mmol/l	KCl
	1	%	Triton X-100
Puffer P1	50	mmol/l	Tris/HCl, pH 8,0
<i>(Plasmidisolierung)</i>	10	mmol/l	EDTA
	100	mg/l	Ribonuklease (RNase)A
Puffer P2	200	mM	NaOH
<i>(Plasmidisolierung)</i>	1	% (w/v)	SDS
Puffer P3	3	M	KOAc, pH 5,5
<i>(Plasmidisolierung)</i>			
Puffer QBT	750	mmol/l	NaCl
<i>(Plasmidisolierung)</i>	50	mmol/l	MOPS, pH 7,0
	15	%	Isopropanol
	1,5	%	Triton X-100

---

Puffer QF	1,25	%	NaCl
<i>(Plasmidisolierung)</i>	50	mmol/l	Tris/HCl, pH 8,5
	15	% (v/v)	Isopropanol
TAE (10x)	Tris-Acetat-EDTA, pH 8,0		
	48,4	g/l	Tris-Base
	11,4	ml/l	Eisessig
	7,44	g/l	Na-EDTA
Trypsin- Lösung	0,1	% (v/v)	Trypsin in EDTA-Lösung

### Lösungen für Patch-Clamp-Experimente:

HEPES-Ringer  
extrazellulär

gepuffert mit 1 mmol/l NaOH, pH 7,4

135	mmol/l	NaCl
5	mmol/l	KCl
1	mmol/l	CaCl <sub>2</sub> <sup>3)</sup>
1	mmol/l	MgCl <sub>2</sub>
10	mmol/l	HEPES

HEPES-Ringer  
intrazellulär

gepuffert mit 1 mmol/l KOH, pH 7,4

140	mmol/l	KCl	
0,4 - 1,5	mmol/l	CaCl <sub>2</sub> <sup>3)</sup>	
1	mmol/l	MgCl <sub>2</sub>	
10	mmol/l	HEPES <sup>1)</sup>	
1,3	mmol/l	EGTA <sup>2)</sup>	
bei Bedarf	(1	mmol/l	ATP)
bei Bedarf	(2	mmol/l	ATP $\gamma$ S)

- 1) HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure])
- 2) EGTA (Ethylenglycol-bis[ $\beta$ -Aminoethylether]N,N,N',N'-Tetraacetat)
- 3) Die Intrazellulärlösungen wurden im Konzentrationsbereich von 0,1  $\mu$ mol/l - 1mmol/l freiem  $\text{Ca}^{2+}$  mit 1,3 mmol/l EGTA<sup>2)</sup> gepuffert. Die einzusetzenden  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen (0,4 - 1,5 mmol/l) wurden mit dem Programm Calc11 berechnet.

## **Toxine und kanalmodifizierende Substanzen**

Alle verwendeten Toxine und kanalmodifizierenden Substanzen wurden direkt in die Extrazellulärlösung gegeben. Die Stamm-Lösungen wurden für die Experimente mit Ringerlösung auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Die Menge der Substanzen wurde so gewählt, daß eine DMSO-Konzentration in der Ringerlösung von 0,5 % nicht überschritten wurde. Kontrolluntersuchungen zeigten keine Änderung der spontanen oder chemisch induzierten Kanalaktivität durch 1 % DMSO in der Ringerlösung.

ALOMONE LABS, JERUSALEM, ISRAEL:

Charybdotoxin

Iberiotoxin

BAYER AG, LEVERKUSEN, DEUTSCHLAND:

Clotrimazol

CALBIOCHEM, BAD SODEN, DEUTSCHLAND:

Bisindolylmaleimid

Calphostin C

SIGMA-ALDRICH-CHEMIE GMBH, TAUFKIRCHEN, DEUTSCHLAND:

1-Ethyl-2-Benzimidazolone

Phorbol-12Myristat-13-Acetat

Theophyllin

### 2.1.4 Oligonukleotide

Die Oligonuklotidsynthese wurde bei der Firma MWG in Auftrag gegeben. Folgende Oligonukleotide wurden in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als Primer verwendet.

*Die mit kleinen Buchstaben wiedergegebenen Nukleotide stehen für degenerierte Positionen der Oligonukleotide.*

<u>Name des Primers</u>	<u>Nuklotidsequenz</u>	<u>Homologie zum</u>
T101As	CGTG GCGCTG <sub>g</sub> CCGGGCGGCA	(+)-Strang cIK1
T101Aa	TGCCGCCCGG <sub>c</sub> CAGCGCCACG	(-)-Strang cIK1
S178As	GCTCAACGCG <sub>g</sub> CCTACCGCAGC	(+)-Strang cIK1
S178Aa	GCTGCGGTAGG <sub>c</sub> CGCGTTGAGC	(-)-Strang cIK1
T329As	CTACAAACAC <sub>g</sub> CACGCAGGAAGG	(+)-Strang cIK1
T329Aa	CCTTCCTGCGT <sub>g</sub> cGTGTTTGTAG	(-)-Strang cIK1
pcDNA3s	CTGGCTTATCGAAATTAATAC	(+)-Strang pcDNA3
pcDNA3	CAGCGAGCTCTAGCATTTAGGTGACAG	(-)-Strang pcDNA3
cIK1-S1	CTGGAGTAATGGGGGTCTGCTG	(+)-Strang cIK1
cIK1-A3	CTTCTCTGCCTTATTAAACTC	(-)-Strang cIK1
cIK1-S2	GATCGTGCTGGAGCTGGCGGTC	(+)-Strang cIK1
EST-BA	GCAGCAGACACCCATGACTCC	(-)-Strang cIK1

### 2.1.5 Vektoren

pBluescriptSK	universeller Klonierungsvektor, STRATAGENE
pcDNA3	Expressionsvektor, INVITROGENE
pEGFP-C1	Expressionsvektor, CLONTECH

### **2.1.6 Zelllinien und Bakterien**

Es wurden folgende Zelllinien verwendet:

HEK293	Adenovirus transfizierte, humane, embryonale Nierenzelle, American Type Cell Culture Collection (ATCC) CRL, 1573
CHO	Dehydrofolatreduktase-defiziente Hamster-Zelllinie, American Type Cell Culture Collection (ATCC) CRL 9096

Es wurde folgender E.coli-Stamm verwendet:

TOP 10 F <sup>c</sup>	INVITROGEN, San Diego, USA
-----------------------	----------------------------

### **2.1.7 Software**

Die computergestützten Analysen von DNA- und Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des Prosite Programmpaketes ([www.expasy.ch/tools/](http://www.expasy.ch/tools/)) und Datenbankrecherchen am Medline-, BLASTN- und BLASTP-Server des NCBI (National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) durchgeführt. Die Aufnahme und Analyse der elektrophysiologischen Messungen erfolgte mit Hilfe des Softwarepaketes PULSE+PULSEFIT. Die Graphen wurden mit der Sigma Plot Software (Jandel, Corte Madera, CA, USA) erstellt.

## 2.2 DNA-Techniken

### 2.2.1 Transformation kompetenter Bakterien

(Sambrook et al., 1989)

Bei der Transformation werden die rekombinanten DNA-Moleküle in lebende Zellen eingeschleust und anschließend durch diese vermehrt.

Zur Transformation des *E.coli*-Stammes top 10 F' wurden 50 µl kompetenter Bakterien mit 2 µl 2-Mercaptoethanol (0,5 mol/l) und 2 µl Ligationsansatz (2.2.7) 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock (30 s, 42°C) und Abkühlen (2 min, 0°C) wurde der Ansatz nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln (250 Upm) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agar mit Kanamycin (70 µg/ml) bzw. Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.2.2 Plasmid-Isolierung

(QIAGEN Plasmid Purification Handbook, QIAGEN 1997)

Es wurden 50 ml LB/Amp-Medium mit einer plasmidtragenden Einzelkolonie des verwendeten Bakterienstammes angeimpft und 12-14 h bei 37°C im Warmluftschüttler (250 Upm) inkubiert. Die Bakterienkultur wurde zentrifugiert (15 min, 4°C, 6000 Upm). Das Bakterienpräzipitat wurde in 4 ml Puffer P1 resuspendiert und mit 4 ml Puffer P2 für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden 4 ml eiskalter Puffer P3 zugesetzt, durch Invertieren des Reaktionsgefäßes durchmischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die nun stark trübe und viskose Lösung wurde 30 Minuten bei 4°C mit 13000 Upm zentrifugiert. Der klare Überstand dieser Lösung wurde auf eine vorher mit 4 ml Lösung QBT äquilibrierte QIAGEN-tip 100-Säule gegeben. Nach zwei Waschschritten mit jeweils 10 ml Puffer QC wurde die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert und durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation (30 min, 4°C, 13000 Upm) wurde das Pellet mit 2 ml eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen und getrocknet. Die

Plasmid-DNA wurde in 100 µl bidestilliertem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Reinheit und Ausbeute der Plasmid-DNA wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

(Saki et al., 1988)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein *in vitro*-Verfahren zur enzymatischen, selektiven Vermehrung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge mit bekannter Teilsequenz.

Die Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in einem sterilen Reaktionsgefäß in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Zu der jeweiligen DNA-Matrize (Template: 100 ng Plasmid-DNA) wurde folgender Ansatz pipettiert:

je 20 pmol	Oligonucleotidprimer
5 µl	PCR-Puffer (10 x)
2 µl	dNTP-Stammlösung (10 mmol/l)
10 µl	Solution Q (5x)
2,5 U	Taq-Polymerase
H <sub>2</sub> O ad	50 µl

Der Ansatz wurde mit dem gleichem Volumen Mineralöl überschichtet und die PCR in einem TrioBlock (Biometra) durchgeführt. Nach einem ersten Denaturierungsschritt (94°C, 5 min) wurde die DNA in 15-35 Zyklen mit folgenden Temperaturschritten amplifiziert.

Denaturierung	94°C	60 Sekunden
Primerhybridisierung	T <sub>m</sub>	60 Sekunden
Synthese	72°C	75 Sekunden

Zum Abschluß der PCR wurde der Reaktionsansatz 10 Minuten bei 72°C inkubiert. Das PCR-Produkt wurde durch Gelelektrophorese (2.2.8) analysiert, gereinigt und weiterverwendet.

Der  $T_m$ -Wert der verwendeten Oligonukleotide wurde nach folgender Näherung berechnet:

$$T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$$

Besaßen die Primer unterschiedliche  $T_m$ -Werte, wurde die Primerhybridisierung bei dem niedrigeren  $T_m$ -Wert durchgeführt. Für jede fehlende Basenpaarung zwischen Primer und Template wurde der  $T_m$ -Wert um 4°C herabgesetzt

#### **2.2.4 PCR zum Nachweis transformierter Bakterienkolonien**

Zur Selektion positiver Klone wurden einzelne Bakterienkolonien eines transformierten Ligationsansatzes mit einer sterilen Pipettenspitze von der LB/Amp-Platte abgenommen und in 20 µl LB-Medium resuspendiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden 2 µl als DNA-Matrize in einer Polymerase-Kettenreaktion (2.2.3) eingesetzt. Bei Nachweis des gewünschten DNA-Fragmentes wurden mit 10 µl Bakteriensuspension 7 ml LB-Medium angeimpft.

#### **2.2.5 Zielgerichtete Mutagenese**

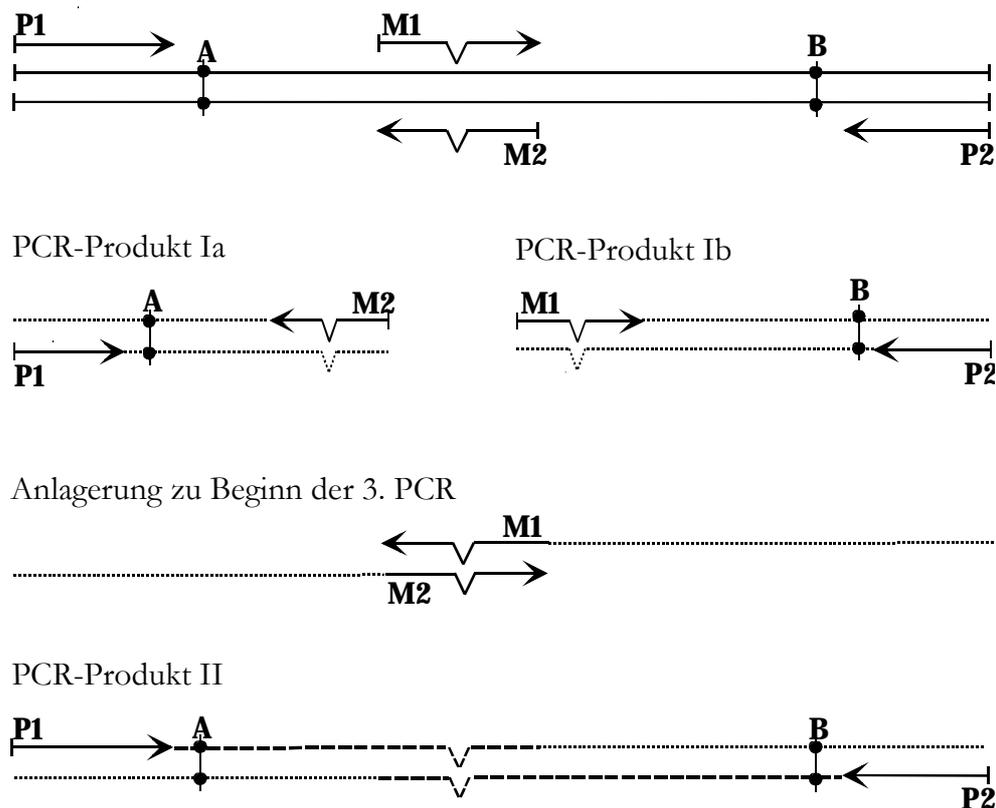
Mit dem Verfahren der zielgerichteten *in vitro*-Mutagenese (Abb. 3) wurde durch Variation der PCR-Methode (2.2.3) eine Punktmutation die bekannte Aminosäuresequenz des cIK1 eingeführt.

Mit zwei Mutageneseprimern (M1 und M2), die im entsprechenden Bereich der Nukleotid-Sequenz den Basenaustausch enthielten und dem Originalstrang an dieser Stelle nicht komplementär waren, und zwei spezifischen Oligonukleotidprimern (P1 und P2) wurden zwei sich im Bereich der Mutation überlappende DNA-Fragmente in zwei

getrennten Ansätzen (Ia und Ib) amplifiziert. Die Lage der Oligonukleotide (P1 und P2) wurde so gewählt, daß innerhalb des amplifizierten DNA- Fragmentes zwei singuläre Restriktionsschnittstellen (A und B) zur Klonierung des mutierten Bereiches in das ursprüngliche Plasmid zur Verfügung standen.

In einer Fusions-PCR wurden jeweils 50 ng dieser PCR-Produkte (Ia und Ib) in neun initial durchgeführten Reaktionszyklen rekombiniert. Das synthetisierte doppelsträngige DNA-Molekül wurde durch anschließende Zugabe der spezifischen Oligonucleotide (P1 und P2) in seiner ganzen Länge amplifiziert (II).

Mittels Restriktionsverdau (2.2.6) und anschließender Ligation (2.2.7) wurde das PCR-Produkt mit der gewünschten Mutation in den Vektor einkloniert und zur Sequenzierung vorbereitet.



**Abb.3: Gerichtete *in vitro* Mutagenese** (Erläuterungen siehe Text)

### **2.2.6 Restriktionsverdau von DNA**

(Sambrook et al.; 1989)

Die zu schneidende DNA wurde mit der berechneten Restriktionsenzymmenge für 1-2 Stunden unter den für das jeweilige Enzym optimalen Bedingungen mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem inkubiert. Bei gleichzeitigem Verdau mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen wurden die dafür veränderten Enzymmengen nach Empfehlung des Herstellers eingesetzt. War ein Parallelverdau aufgrund der notwendigen Pufferbedingungen nicht möglich, wurde sequentiell verdaut und zwischen den Restriktionen eine Hitzeinaktivierung (20 min, 65°C) durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 x DNA-Probenpuffer gestoppt. Nach dem Restriktionsverdau wurde der Ansatz gelelektrophoretisch (2.2.8) getrennt.

### **2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten**

(Sambrook et al., 1989)

In einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurden 30-50 ng Vektor-DNA mit einem sechsfachen molaren Überschuß an Fragment-DNA mit 2 µl 5 x Ligasepuffer und 1,5 U T4-DNA Ligase wahlweise bei Raumtemperatur oder 16°C für mindestens 12 Stunden inkubiert.

### **2.2.8 Gelelektrophorese**

(Sambrook et al., 1989)

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde in horizontalen Agarosegelen in 1 x TAE Puffer durchgeführt. Zur UV-Detektion der DNA-Fragmente wurde dem Gel Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml dem Gelpuffer zugesetzt. Je nach Trennproblem wurde eine Agarosekonzentration zwischen 0,5 und 2 % gewählt. Die für die Elektrophorese verwendeten Gelkammern waren Eigenbauten der

Werkstatt des Physiologischen Instituts. Der zu analysierende Ansatz wurde mit dem entsprechenden Volumen DNA-Probenpuffer (10 x) vermennt und mindestens 30 Minuten bei 80 V aufgetrennt. Durch Photographie des Gels wurden die Ergebnisse dokumentiert.

### **2.2.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

(QIAquick Spin Handbook, QIAGEN, 1996)

Das die DNA enthaltende Gelstück wurde ausgeschnitten und in einem Eppendorf-Reaktiongefäß mit dem dreifachen Volumen Puffer QX1 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Der gelöste Ansatz wurde auf Säulen gegeben und 1 Minute mit 13000 U<sub>pm</sub> zentrifugiert. Die Säulen wurden einmal mit 500 µl Puffer QX1 und zweimal mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Anschließend wurden die Säulen getrocknet, die DNA mit 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert und durch Zentrifugation von den Säule getrennt.

### **2.2.10 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA-Proben wurde deren optische Dichte in einer Quarzküvette photometrisch bestimmt. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Eine Extinktion von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht einem Gehalt von 50 µg DNA. Mit der Messung bei 280 nm wurde die Absorption von Proteinen und Phenolresten bestimmt. Zur Abschätzung der Reinheit wurde der Quotient der relativen Absorptionen von 260 nm/280 nm berechnet, der bei reinen DNA-Lösungen bei ca. 1,8 liegt.

### **2.2.11 DNA-Extraktion und -Präzipitation**

(Sambrook et al., 1989)

Zur Entfernung von Proteinen aus einer wässrigen Nukleinsäurelösung wurde diese mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1 gesättigt mit TE) versetzt, 1 Minute auf dem Vortex gemischt und zentrifugiert (13000 Upm, 3 min, RT). Die wäßrige Phase wurde vorsichtig und möglichst vollständig abgenommen und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt

Zum Fällen von DNA aus wässrigen Lösungen wurden diese mit 10% Volumen 3 mol/l Natriumacetat (pH 5,2) und 3 Volumen 100%igem Ethanol versetzt und 1 Stunde bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die DNA pelletiert (13000 Upm, 30 min 4°C), einmal mit 500 µl 75%igem Ethanol gewaschen, 10 Minuten bei 34°C getrocknet und in bidestilliertem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.2.12 DNA-Sequenzierung**

(Sanger et al.; 1977)

Die DNA-Sequenzierungen wurden durch die Fa. MWG-BIOTECH durchgeführt.

## **2.3 Arbeiten auf zellulärer Ebene**

Die Arbeiten mit Zellen wurden in einer sterilen Werkbank (Heraeus Laminarflow) in einem vom übrigen Labor abgetrennten Raum durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in den entsprechenden Nährmedien (Zusammensetzung der zellspezifischen Medien siehe (2.1.3) in Gegenwart von 10% FCS (fetal calf serum) in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, und vollständiger Wasserdampfsättigung der Gasatmosphäre. Es wurde mit Chinese Hamster Ovary (CHO) und Human Embryonic Kidney-293

(HEK293) Zellen gearbeitet, die eine nur geringe endogene Kaliumkanalexpression aufwiesen.

### **2.3.1 Langzeitlagerung und Routinehaltung von Zellen**

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen oder Kulturschalen bis zur Konfluenz des Zellrasens kultiviert und im 3-4 Tage-Rhythmus subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit einer EDTA-Lösung (0,2 g/l) gewaschen, um  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Extrazellulärraum zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen durch enzymatische Proteolyse mit 0,1 % Trypsin von der Unterlage abgelöst und durch auf- und abpipettieren separiert. Durch Zugabe von Kulturmedium wurde die Trypsinbehandlung abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen zur weiteren Kultivierung in Kulturflaschen und für die elektrophysiologischen Experimente in Petrischalen (2.3.2) ausgesät.

Zur Aufrechterhaltung geringer Passagen und zur langfristigen Lagerung der verwendeten Zelllinien wurden die Zellen in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Zellen einer 70% konfluenten Kulturflasche wurden zunächst trypsinisiert und mit FCS-haltigem Medium gewaschen. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500 Upm und Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 2 ml eiskaltem Medium mit 20 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in 1 ml Aliquots über Nacht auf  $-80^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und anschließend in Flüssig-Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die in 1 ml Aliquot eingefroren Zellen im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Um das toxische Frostschutzmittel DMSO möglichst schnell zu entfernen, wurden die Zellen mit der zehnfachen Menge an FCS-haltigem Medium ( $37^{\circ}\text{C}$ ) resuspendiert und für 5 Minuten bei 1500 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen im DMSO-freien Sediment mit  $37^{\circ}\text{C}$  warmem Medium resuspendiert und kultiviert.

### **2.3.2 Aussaat von Zellen für die Elektrophysiologie**

Für die elektrophysiologische Charakterisierung wurden voneinander isoliert liegende Zellen in Schalen mit 35 mm Außendurchmesser verwendet. Bei der Passage von Zellen in der Erhaltungskultur (2.3.1) wurden diese auf  $2,5 \times 10^4$  Zellen pro ml Medium verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 2 ml je Schale ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

### **2.3.3 Transiente Transfektion**

Als Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA in eine lebende eukaryotische Zelle bezeichnet.

Die Transfektion von Expressionsvektoren in eukaryote Gewebezellen wurde unter Verwendung von kationischen Lipiden durchgeführt. Die zu transfizierenden Zellen wurden in Gewebekulturschalen (35 mm Durchmesser) bis zur 70%igen Konfluenz kultiviert. Direkt vor der Transfektion wurden die Zellen mit OPTI-MEM I überschichtet und bis zur Applikation der Transfektionslösung im Brutschrank inkubiert.

Zur Herstellung des Transfektionsansatzes wurden 3-5 µg Plasmid-DNA mit 500 µl OPTI-MEM I in einem sterilen Reaktionsgefäß durchmischt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 6.4 µl der kationischen Lipid-Lösung mit 500 µl OPTI-MEM I verdünnt. Beide Ansätze wurden vermengt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, nachdem das OPTI-MEM I entfernt wurde, mit dem Transfektionsansatz überschichtet und im Brutschrank inkubiert. Nach einer Transfektionszeit von 4-5 Stunden wurde die Transfektionslösung durch 2 ml Nährmedium ersetzt und die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für die elektrophysiologischen Messungen ausgesät (2.3.2). Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden 36-48 Stunden nach der Transfektion durchgeführt.

Die optimalen DNA- und Lipid-Mengen variierten in Abhängigkeit vom Zelltyp und Expressionsvektor.

Um eine optische Kontrolle des Transfektionserfolges zu ermöglichen, wurde eine Kotransfektion der in den pcDNA3-Vektor inklonierten cIK1-cDNA, mit dem pEGFP-C1 Expressionsplasmid (CLONTECH) durchgeführt. Auf diese Weise konnten erfolgreich transfizierte Zellen, die das EGFP (enhanced green fluorescent protein) exprimierten, aufgrund ihrer grünen Fluoreszenz identifiziert werden.

### **2.3.4 Stabile Transfektion**

Bei der stabilen Transfektion werden fremde Gene ins Genom von Zelllinien integriert und so deren dauerhafte Expression bewirkt.

Zur Erzeugung stabil cIK1-exprimierender HEK293-Zellen wurden diese wie oben beschrieben (2.2.3) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion begann durch die Zugabe einer für nicht transfizierte Zellen toxischen Menge G418 (2.1.3; Endkonzentration von 0,5 - 1 mg/ml G418) die Selektion stabil transfizierter Zellen. Die Selektion beruht darauf, daß mit dem pcDNA3-Vektor auch eine Resistenz für dieses Antibiotikum übertragen wird. Hierzu wurden im Verlauf von 7-10 Tagen alle 2-3 Tage das Medium durch frisches ersetzt, dem die entsprechende Menge G418 zugesetzt worden war. Das Wachstum der Zellen und evtl. entstehender Kolonien wurde bei dieser Gelegenheit überprüft.

Wenige Tage nach Selektionsbeginn starben nicht transfizierte Zellen ab und lösten sich vom Gefäßboden ab. Transfizierte Zellen wurden nach Erreichen von 70%iger Konfluenz in Zellkulturflaschen überführt und zur Erhaltungskultur in G418-haltigem Medium kultiviert oder eingefroren (2.3.1).

## 2.4 Elektrophysiologische Methoden

Alle elektrophysiologischen Experimente dieser Arbeit erfolgten mit der Methode der Membranflechklemme (Patch-Clamp), wie sie von Neher und Sakmann (1976) zum ersten Mal erwähnt und von Hamill et al. (1981) in erweiterter Form beschrieben wurde.

### 2.4.1 Theorie der Patch-Clamp-Technik

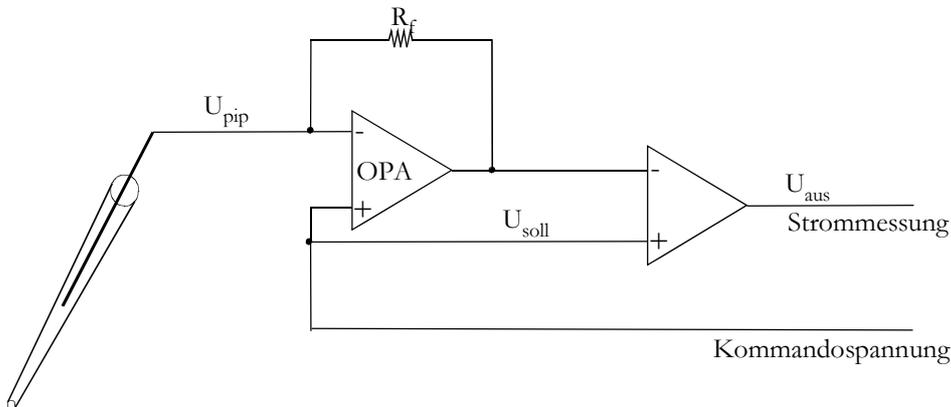
Die Patch-Clamp-Technik stellt eine Variante des Voltage-Clamp Verfahrens dar, welches in den 30er Jahren von Cole und Curtis entwickelt wurde und seinen klassischen Durchbruch mit Hodgkin, Huxley und Katz fand (1949).

Die Methode der Spannungsklemme besteht darin, das Membranpotential einer Zelle auf bestimmte konstante Werte einzustellen (klemmen) und den dann durch die Membran fließenden Strom zu messen. Aus diesem Strom, der sich aus einer ionalen und einer kapazitiven Komponente sowie einem Verluststrom (Leckstrom) zusammensetzt, kann die Leitfähigkeit bestimmt werden, die proportional zur Ionenkanalaktivität ist.

$$I_x = (U_{\text{soll}} - E_m) \times g_x$$

$I_x$  = Stromamplitude  
 $U_{\text{soll}}$  = Kommandopotential  
 $E_m$  = Membranpotential  
 $g_x$  = Leitfähigkeit

Es besteht eine lineare Proportionalität zwischen gemessenem Strom und Leitfähigkeit, da die Einstellung der Sollspannung ( $U_{\text{soll}}$ ) am Verstärker über einen negativen Rückkopplungsmechanismus erfolgt (Abb. 4). Sobald eine Spannungsdifferenz zwischen gemessenem Membranpotential und der vorgegebenen Kommandospannung am Eingang des Operationsverstärkers (OPA) registriert wird, wird durch Injektion eines entgegengerichteten Stroms in die Zelle diese Differenz kompensiert. Der Betrag des Stroms, der durch den Verstärker geliefert wird, ist genauso groß wie der Ionenstrom, der durch die Membran hindurchfließt.



**Abb. 4: Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers**

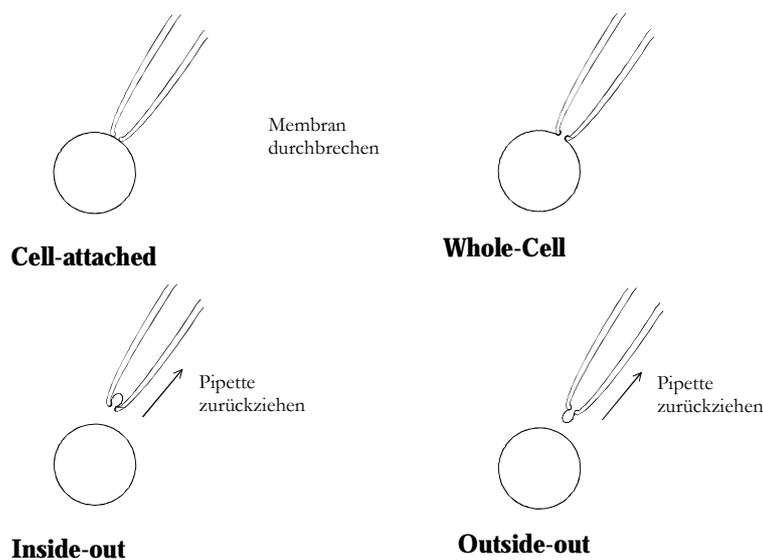
$R_f$  Rückkopplungswiderstand, OPA: Operationsverstärker,  $U_{soll}$ : Kommando- oder Sollspannung,  $U_{pip}$ : Pipettenpotential,  $U_{aus}$ : Ausgangsspannung proportional zum Strom

### 2.4.2 Meßanordnungen

Der Unterschied der Patch-Clamp-Technik gegenüber der Voltage-Clamp-Methode liegt vor allem in der äußerst hohen Auflösung der Registrierungen, die es ermöglicht, Ströme einzelner Ionenkanäle aufzunehmen. Aufgrund eines extrem hohen Abdichtwiderstandes ( $>10^9\Omega = \text{Gigaseal}$ ) zwischen Pipette und Zellmembran wird das Membranstück unter der Pipette elektrisch von der Umgebung und ihrem Hintergrundrauschen isoliert und Leckströme werden weitgehend verhindert. Diese Abdichtung wurde realisiert, indem eine saubere Pipette unter geringem Überdruck an die Zelle herangeführt wurde, bis eine leichte Eindellung an der Membran zu erkennen war, und unter Anlegen eines minimalen Unterdrucks spontan ein Seal entstand. In dieser sog. cell-attached-Konfiguration können Ströme durch einzelne Ionenkanäle registriert werden.

Durch eine weitere Steigerung des Unterdrucks wird die Membran in der Pipettenöffnung aufgebrochen. Durch dieses Verfahren gelangt man in die Whole-Cell-Konfiguration (Ganzzelleableitung). Mit dieser Methode der Patch-Clamp-Technik ist es möglich, den Strom über der gesamten Membran einer Zelle zu erfassen und die Ionenkonzentration des Cytoplasmas zu kontrollieren.

Von der Ganzzelle ableitung erreicht man die Outside-out-Konfiguration, indem man die Pipette von der Zelle abzieht. Die Membran schließt sich dabei über der Pipette zu einer Art Halbvesikel, dessen Membranaußenseite der Badlösung zugewandt ist. Nach Erreichen eines Seals gelangt man durch langsames Abziehen der Pipette von der Membran in die Inside-out-Konfiguration. In diesem Modus wird die zytoplasmatische Oberfläche des Membranflecks zur Badlösung exponiert.



**Abb.5: Die Meßkonfigurationen und ihre Herstellung.**

Die Abbildung zeigt die vier wichtigsten Meßkonfigurationen der Patch-Clamp-Technik. (Modifiziert nach Hamill et al., 1981)

Die in dieser Arbeit vorgestellten elektrophysiologischen Experimente wurden bei Raumtemperatur im whole-cell-Modus und in der inside-out-Konfiguration durchgeführt.

### 2.4.3 Meßplatz

Um störende Einflüsse mechanischer Schwingungen zu verhindern, ist es notwendig, die hochempfindlichen Patch-Clamp-Messungen an einem erschütterungsarmen Arbeitsplatz durchzuführen. Dazu wurde die Meßapparatur auf einem schwingungsgedämpften Arbeitsplatz aufgebaut. Um Störungseinflüsse durch Einstreuung von Netzspannungen

zu verhindern, wurde der Meßtisch von einem Faradaykäfig umgeben, der neben der elektrischen, der optischen Abschirmung diente und zur Befestigung der Perfusionsanlage genutzt wurde. Alle elektrisch leitenden Teile wurden an einem gemeinsamen Punkt geerdet.

Die Beobachtung der Zellen während eines Experimentes erfolgte bei 400-facher Gesamtvergrößerung durch ein inverses Mikroskop (IM35, Fa. Zeiss), welches mit einer Fluoreszenzeinrichtung ausgestattet war (Anregungsfilter BP 450/490, Sperrfilter LP 520, Fa. Zeiss). Die notwendige Fluoreszenzleuchte war mit einem Kollektor versehen und wurde durch ein eigenes Netzgerät versorgt.

Der motorbetriebene 3-achsige Mikromanipulator war an einer vom Mikroskop getrennten Magnetsäule montiert. Im Winkel von 45° wurden daran der Pipettenhalter und Vorverstärker des verwendeten Patch-clamp-Verstärkers (EPC7) befestigt. Kontrollierbar war das System über eine Handsteuerung (Joystick), die eine minimale Schrittweite von 0,1 µm zuließ.

Die Meßkammer wurde in einer Ausfräsung des Objektisches befestigt, der auf dem Mikroskoptisch befestigt war und horizontal in zwei Ebenen bewegt werden konnte. Die Experimente wurden in Petrischalen aus Plexiglas mit einem Außendurchmesser von 35 mm durchgeführt. Zur Verminderung des Badvolumens wurde ein Plexiglaseinsatz (Eigenbau der Werkstatt des Physiologischen Institutes), der Aussparungen für die Badelektrode und den Zu- und Ablauf der Superfusion hatte, in die Kulturschalen gelegt.

An der Wand des Faraday-Käfigs wurden die Kolben von 50 ml Spritzen als Vorratsgefäße für die Lösungen zur Superfusion der Zellen mit Ringerlösung und zur Applikation der spezifischen Pharmaka in einer Plastikhalterung befestigt. Die Schläuche wurden durch Tropfenfallen unterbrochen, um ein durch die Antennenwirkung der mit salzhaltigen Lösungen gefüllten Leitungen aufgefangenes 50 Hz Störsignal vom Meßsignal zu entkoppeln. Die Kontrolle der Superfusionsgeschwindigkeit erfolgte durch Gravitation (Zulauf) bzw. unter Verwendung einer Pumpe (Ablauf).

#### 2.4.4 Pipettenpräparation

Die Patchpipetten wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren hergestellt. Diese waren aufgrund ihrer geringen Leitfähigkeit, die das intrinsische Rauschen der Pipette und die kapazitiven Ströme gering hielt, für die durchzuführenden Messungen besonders geeignet. Die Glasrohlinge, mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einem Innendurchmesser von 0,86 mm wurden mittels eines horizontalen Pipettenziehgerätes in zwei Stufen mit den angegebenen Parametern gezogen:

Heat 1	635	≅ 19 - 20 A
Heat 2	553	≅ 16 - 17 A
Heat Duration	1000 ms	
Pause Duration	40 ms	
Cooling Delay	5 ms	
Pullung Position	17	≅ 3,4 mm
Spring Position 1	500	
Spring Position 2	500	
Brake Selektion 1	255	
Brake Selektion 2	200	

Um Schwankungen der Pipettenöffnungen (2 - 4 M $\Omega$ ) auszugleichen, wurde die Hitze des zweiten Schrittes variiert.

Für Messungen in der inside-out Konfiguration wurden die Pipetten mit Sylgard beschichtet, um das mit der Pipettenkapazität gekoppelte Rauschen zu minimieren. Das Beschichten der Pipetten erfolgte mit Hilfe einer zugeschmolzenen Pasteurpipette unter optischer Kontrolle unter einem Binokular. Durch Heranführen der Pipettenspitze an eine schwach glühende Heizspirale wurde das Sylgard anschließend ausgehärtet.

Das Befüllen der Pipetten erfolgte von der Rückseite durch 1 ml Spritzen, die einen Befüllungsaufsatz (Microfil 28 AWG) hatten. Um Störsignale während der Messung zu minimieren, wurde darauf geachtet, die Pipetten nur so weit zu befüllen, daß der Elektrodendraht gerade in die Pipettenlösung eintauchte.

---

Die Pipetten- und Badelektrode bestand aus einem 0,5 mm dicken Silberdraht, der regelmäßig in einer HCl-Lösung der Konzentration 1 mol/l neu chloriert wurde.

### **2.4.5 Datenerfassung und Analyse**

Die Steuerung des EPC 7 (Extracellular-Patch-Clamp Verstärker) zur Stimulation, Datenaufnahme und -auswertung erfolgte über ein ITC 16 Interface mit einem Personal Computer.

Der verwendete EPC 7 verfügte über einen Verstärkungsbereich von 0,5 - 1000 mV/pA. In den Bereichen von 0,5 - 20 mV/pA erlaubte ein vorgeschalteter Brückenwiderstand von 500 M $\Omega$  mit einer sich daraus ergebenden Frequenzbandbreite von bis zu 100 kHz die Aufnahme von Strömen bis zu 20 nA. Im Bereich von 50 - 100 mV/pA wurde ein Widerstand von 50 G $\Omega$  vorgeschaltet, aus dem eine Frequenzbandbreite bis zu 50 kHz resultiert. Das Gerät ermöglichte es, Spannungen von -200 bis +200 mV an die Pipette zu legen. Die durch die Reizimpulse entstandenen kapazitiven Ströme, die vor allem bei Ganzzelleableitungen bei plötzlichen Änderungen der Klemmpotentiale entstehen können, konnten durch eine elektronische kapazitive Kompensation mit zwei zeitlich verschiedenen Komponenten kompensiert werden. Ströme, die sich aufgrund einer Kapazität von 0,4 - 10 pF mit einer Zeitkonstanten von 0,5 - 5  $\mu$ s ergaben, konnten mit der Komponente  $C_{fast}$  kompensiert werden. Die zweite Komponente  $C_{slow}$  kompensierte Kapazitäten von bis zu 100 pF. Über den Serienwiderstand (RS) konnten Fehlerspannungen der Membran, die z.B. durch den Zutrittswiderstand zwischen Pipettenelektrode und Zelle hervorgerufen wurden, kompensiert werden. Um zu gewährleisten, daß die durch den Verstärker vorgegebene Spannung hauptsächlich über der Zellmembran abfiel, wurde der RS möglichst klein gehalten. Es wurden nur Experimente berücksichtigt, die einen seriellen Widerstand von weniger als 10 M $\Omega$  aufwiesen.

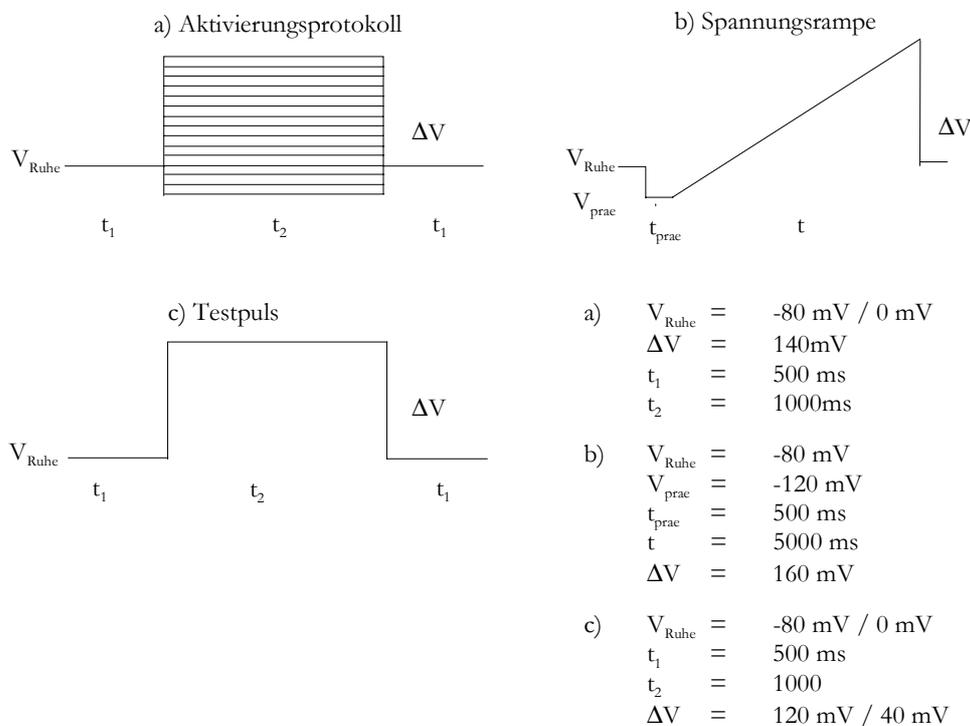
Die Filterung der analogen Stromsignale des Verstärkers erfolgte mit einem internen Tiefpass-Filter des EPC 7, das nur Frequenzen mit >10 kHz dämpfte (3-db, 3-Pol Bessel).

Die gesammelten Meßdaten wurden mit einem AD/DA-Wandler des Types ITC 16 mit 16 Bit digitalisiert und direkt auf der Festplatte des PC gespeichert. Die Steuerung des Verstärkers erfolgte halbautomatisch über einen in den Computer integrierten Impulsgenerator, der über die Datenerfassungssoftware gesteuert wurde. Die Datenaufnahme wurde im Verlauf eines Experimentes über ein virtuelles Oszilloskop auf dem Monitor des PC kontrolliert.

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit Hilfe des Softwarepaketes PULSE +PULSEFIT. Die graphische Darstellung der Daten wurde mit dem Programm Sigma-Plot durchgeführt.

## 2.4.6 Pulsprotokolle

Die Pulsprotokolle (Abb.: 6) wurden mit dem Pulsgenerator der PULSE-Software generiert. Je nach Bedarf wurde dabei die Dauer der einzelnen Segmente sowie die Digitalisierungsfrequenz angepaßt.



**Abb.6: Pulsprotokolle** (Erklärungen siehe Text)

## **Aktivierungsprotokoll**

Bei diesem Protokoll wurden ausgehend von einem Ruhepotential (-80 mV bzw. 0 mV) Spannungssprünge in 10 mV Schritten appliziert (Abb. 6a). Die Dauer der Spannungspulse betrug 1000 ms. Die Zeit zwischen den Spannungssprüngen betrug 1000 ms.

Zum Erstellen einer Strom-Spannungskennlinie (IV-Kurve) wurden die Fließgleichgewichtsströme dieses Protokolls bei verschiedenen Haltepotentialen gegen die Membranspannung aufgetragen. Der Schnittpunkt dieser Kennlinie mit der Spannungsachse ergab das sogenannte Umkehrpotential ( $U_{rev}$ ), welches von den ionalen Bedingungen auf beiden Seiten der Membran abhing und als wichtigste Meßgröße zur Bestimmung der Ionenselektivität des untersuchten Ionenkanals diente.

Bei Messungen mit äquimolarer  $K^+$ -Konzentration wurde auf ein Ruhepotential von 0 mV, bei physiologischem  $K^+$ -Gradienten auf ein Ruhepotential von -80mV geklemmt

Zum Vergleich der Strom-Spannungskurven verschiedener Messungen, wurden die Meßpunkte durch Division durch den jeweiligen Maximalwert normiert.

## **Spannungsrampe**

In der inside-out-Konfiguration wurden depolarisierende Spannungsrampen appliziert (Abb. 6b). Ausgehend vom aktuellen Ruhepotential wurde für 500 ms ein hyperpolarisierender Vorpuls appliziert, bevor die 5 s dauernde Rampe, die sich maximal über  $\Delta$  160 mV erstreckte, ausgeführt wurde. Zum Berechnen der Leitfähigkeiten wurden die Stromantworten von mindestens 10 Rampen eines "Patches" ermittelt.

## **Testpulse**

Zur Kontrolle der Wirkung spezifischer Pharmaka wurden 500 ms dauernde depolarisierende Testpulse ( $\Delta$  120 mV bzw. 40 mV ) ausgehend vom Haltepotential

---

angelegt (Abb. 6c). Nach ca 5 min Superfusion (ca. 10-facher Austausch des Badvolumens) der Zellen mit der Testlösung wurden die Mittelwerte der Stromamplitude ermittelt, nachdem sich ein Fließgleichgewicht (steady-state) eingestellt hat.

Die mit diesem Pulsprotokoll gewonnenen Daten wurden durch Division durch den Meßwert unter Standardbedingungen auf die Kontrolle normiert. Eine kinetische Anpassung der Daten zur Berechnung der halbmaximalen Wirkkonstanten ( $IC_{50}$ ) wurden nach folgender von der Michaelis-Menten-Beziehung abgeleiteten Gleichung berechnet:

$$f = \frac{m \cdot x}{k + x}$$

$$k = IC_{50}$$

$$m = \text{Maximaleffekt}$$

#### **2.4.7 Statistik**

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Die gezeigten Werte enthalten Daten von mindestens drei unterschiedlichen Zellpassagen. Die statistische Signifikanz wurde durch den einseitigen bzw. zweiseitigen, ungepaarten Student t-Test bestimmt. Die Ergebnisse wurden ab  $p < 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet.

### **3. Ergebnisse**

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven  $\text{K}^+$ -Kanals aus MDCK-Zellen (cIK1) und die Untersuchung seiner Regulierung durch die Proteinkinase C. Die cDNA wurde in einem heterologen System exprimiert und die von den Proteinen vermittelten Ströme wurden mit Hilfe der Patch-Clamp Technik hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften charakterisiert. Um zu untersuchen, ob eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase C direkt am Kanalprotein erfolgt, wurden die putativen Phosphorylierungsstellen des Kanals mittels zielgerichteter Mutagenese so verändert, daß dort eine Phosphorylierung nicht mehr möglich war. Die funktionellen Auswirkungen dieser Mutationen wurden anschließend elektrophysiologisch untersucht.

---

## 3.1 Strukturanalyse

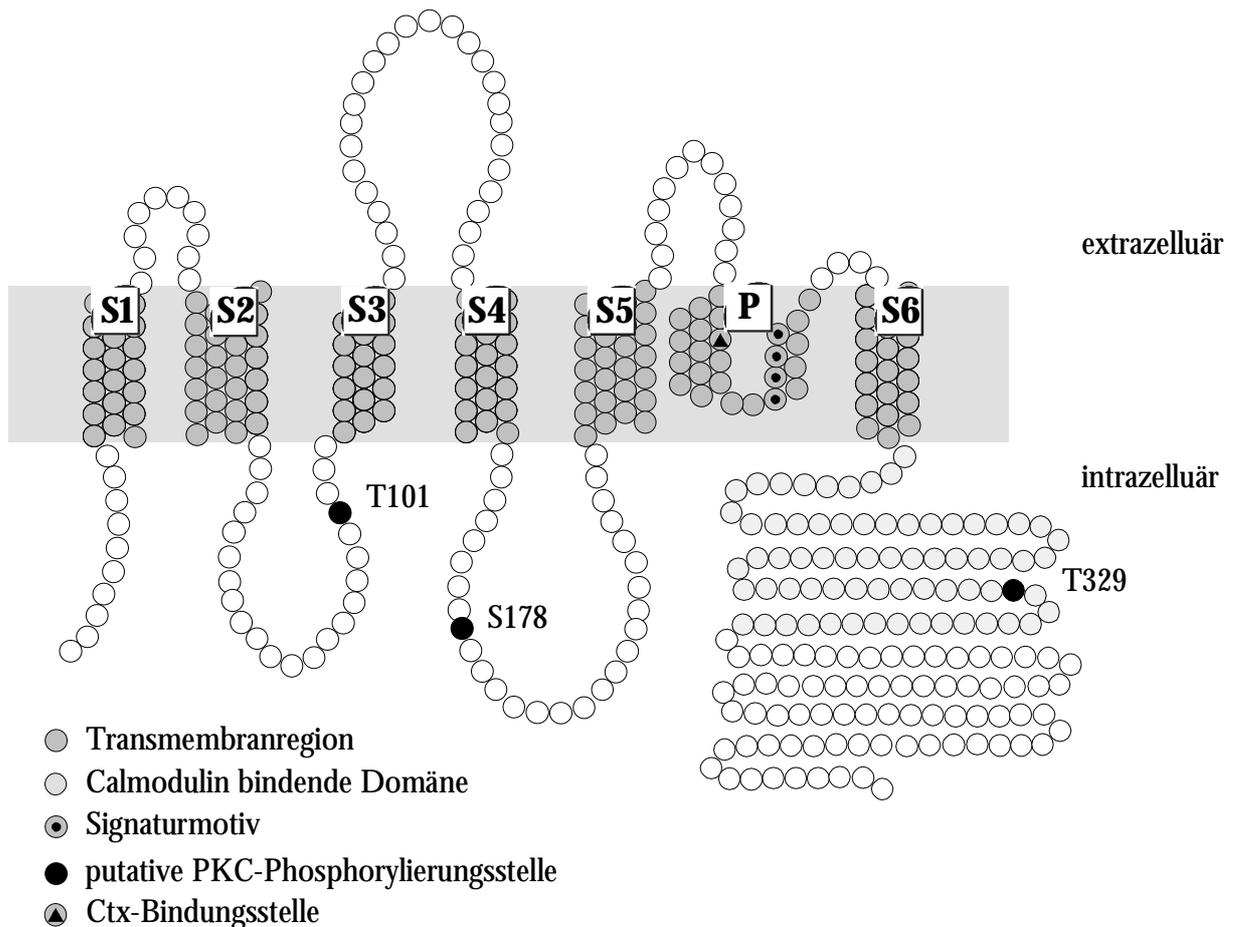
### 3.1.1 Proteinsequenzvergleich und Sequenzanalyse

Die Hunde-Isoform des IK1-Kanals wurde aus migrierenden transformierten MDCK-F-Zellen kloniert (Schwab et al., 2001). Die cDNA codiert für ein 437 Aminosäuren langes K<sup>+</sup>-Kanalprotein, das zur Isoform des Menschen eine 91%ige (Ischii et al., 1997; Joiner et al., 1997), der Maus eine 87%ige (Vandorpe et al., 1998) und der Ratte eine 85%ige (Neylon et al., 1999) Sequenzhomologie aufweist. Die Übereinstimmungen der IK1-Kanäle beruhen auf einer gemeinsamen Topologie (Abb. 7) mit sechs Transmembransegmenten, einem intrazellulären C- und N-Terminus und einer putativen Porenregion zwischen dem fünften und sechsten Membransegment. Die Porenregion enthält das für Kaliumkanäle typische Signaturmotiv GYGD und einen Aspartatrest (D239), der für die Bindung von Charybdotoxin (Rauer et al., 2000) wichtig ist. Neben den Sequenzübereinstimmungen in den genannten Strukturelementen besitzen alle Mitglieder der IK1-Kanalfamilie im proximalen Bereich des C-Terminus eine Calmodulin-bindende Domäne (Fanger et al., 1999). Der Vergleich der Sequenzen zeigt, daß die wesentlichen Unterschiede zwischen dem cIK1 und den anderen bekannten Isoformen im zweiten extrazellulären Verbindungsglied (8 Aminosäuren) und dem cytoplasmatischen C-Terminus (18 Aminosäuren) liegen.

Die Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe des Prosite Programmpaketes ([www.expasy.ch/tools/](http://www.expasy.ch/tools/)) auf Konsensussequenzen für Phosphorylierung und Glykosylierung untersucht. Alle o.g. IK1-Isoformen enthalten zahlreiche Konsensussequenzen für die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC), cAMP- oder cGMP-abhängige Proteinkinase (PKA) und Caseinkinase II. Weiterhin finden sich Aminosäuren, die möglicherweise durch N-Glycosylierung modifiziert werden können.

Zu den konservierten Konsensussequenzen gehören drei putative Stellen für die Phosphorylierung durch die PKC. Die erste befindet sich im intrazellulären Bereich zwischen den Membransegmenten S2 und S3 (T101), die zweite im Intrazellulärraum zwischen S4 und S5 (S178) und die dritte im proximalen Abschnitt des C-Terminus

(T329). Im Gegensatz zum cIK1 haben die anderen IK1-Kanäle weitere nicht konservierte PKC-Phosphorylierungsstellen (Mensch 4, Ratte 4, Maus 5). Außerdem fehlt dem cIK1 die einzige PKA-Phosphorylierungsstelle, die nicht nur bei anderen Mitgliedern der IK1-Familie konserviert ist, sondern auch bei den SK-Kanälen vorhanden ist.



**Abb.7: Sequenzmodell des cIK1**

Schematisches Modell der mutmaßlichen Topologie des cIK1 mit den sechs Transmembranregionen S1 bis S6, der Pore zwischen S5 und S6, der Calmodulin-bindenden Domäne und den drei putativen PKC-Phosphorylierungsstellen

Die Möglichkeit einer Phosphorylierung des Kanalproteins besteht beim cIK1 an nur drei Bindungsstellen für die PKC und erleichtert daher die Untersuchung der Regulierung durch eine direkte Phosphorylierung. Aufgrund der strukturellen Homologie des cIK1 zu anderen IK1-Isoformen lassen sich die Ergebnisse zur funktionellen Regulierung dieses Kanals auf die anderen Mitglieder der IK1-Familie übertragen.

## 3.2 Charakterisierung des Expressionssystems

### 3.2.1 Heterologe Expression von cIK1

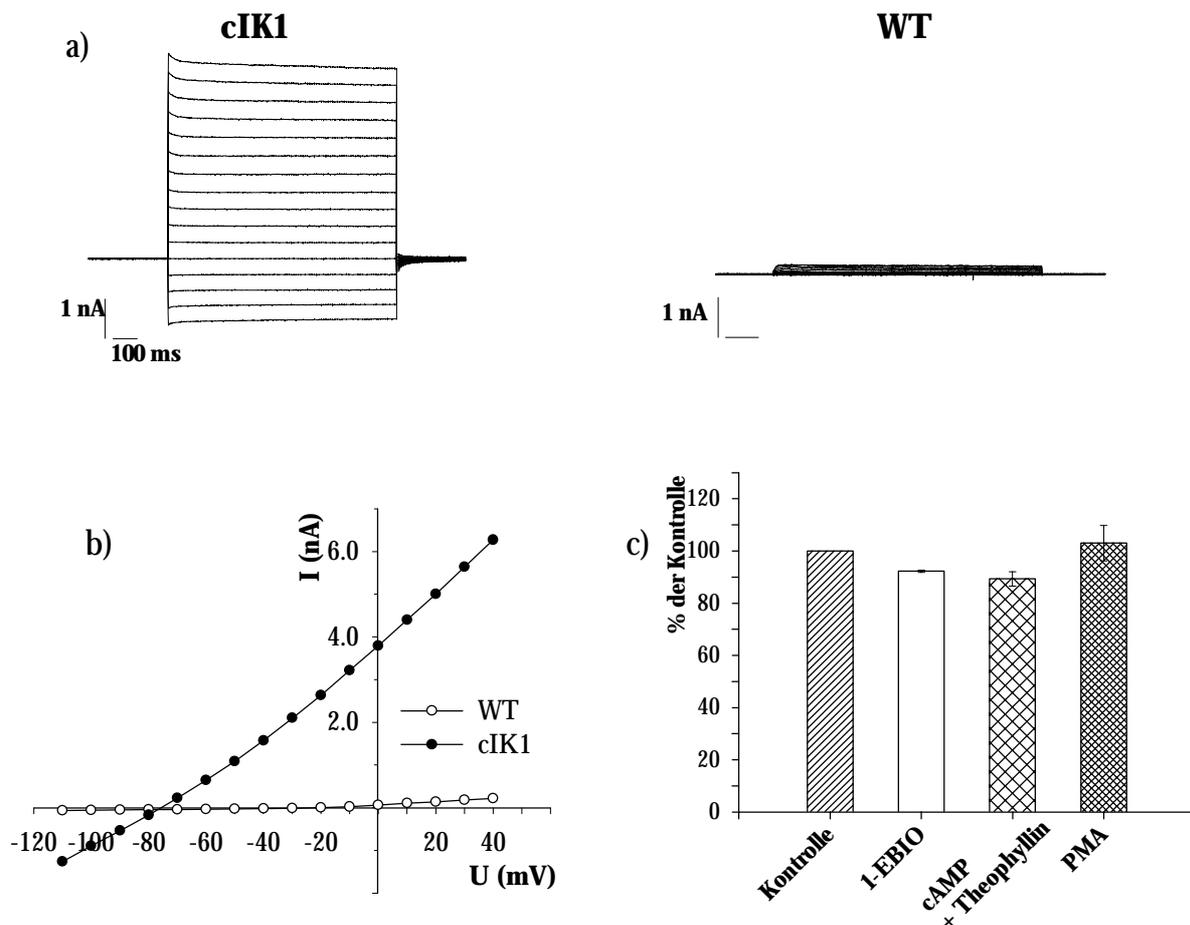
Zur funktionellen Charakterisierung der Eigenschaften des cIK1 und zur Analyse seiner Regulierung wurden die Kanalproteine heterolog in mammalischen Gewebekulturzellen exprimiert. Um funktionelle Unterschiede in Abhängigkeit vom Expressionssystem ausschließen zu können, wurden sowohl CHO- als auch HEK293-Zellen mit der cIK1-cDNA transfiziert.

Bei der transienten Transfektion mit Lipofectin wurden Transfektionsausbeuten von 40 - 50% erreicht. Zur optischen Identifizierung erfolgreich transfizierter Zellen erfolgte eine Kotransfektion mit dem Expressionsvektor pEGFP-C1. 90% aller grün fluoreszierenden Zellen exprimierten den Kanal.

Zur Erzeugung dauerhaft exprimierender Zelllinien wurden HEK293 Zellen stabil mit der cDNA des cIK1 transfiziert. Isolierte Zellklone waren gegen das für Wildtypzellen toxische G418 resistent. In über 90% aller selektionierten Zellen ließ sich der Kanal nachweisen. In Abbildung 8a ist ein Vergleich der Ganzzell-Stromantworten nativer und transfizierter Zellen dokumentiert. Transfizierte Zellen wiesen Stromamplituden von bis zu  $>20$  nA auf. Ursache für die Kanalüberexpression ist die durch den viralen Promotor (pCMV) regulierte Transkription, die dazu führt, daß die heterologen Proteine im Überschuß produziert werden. Wildtypzellen hingegen zeigten keine oder eine nur geringe endogene Kanalexpression (Ganzzell-Strom  $<100$  pA bei +40 mV). In Abbildung 8b sind die Strom-Spannungsbeziehungen von transfizierten und Wildtypzellen dargestellt. Das Umkehrpotential von -80 mV bei physiologischem  $K^+$ -Gradienten zeigt, daß in transfizierten Zellen eine überwiegende Membranleitfähigkeit durch  $K^+$ -selektive Kanäle besteht. Im Gegensatz dazu zeigt ein Umkehrpotential von -10 mV bei nativen HEK293-Zellen, daß endogene  $K^+$ -Kanäle nur in einem geringen Ausmaß zur Gesamtleitfähigkeit der Membran beitragen.

Nicht transfizierte CHO- und HEK293-Zellen wurden mit den in den folgenden Versuchen verwendeten Substanzen behandelt, um ausschließen zu können, daß die

verwendeten Aktivatoren (300  $\mu\text{mol/l}$  1-EBIO, 1  $\text{mmol/l}$  Theophyllin, 0,1  $\mu\text{mol/l}$  PMA) die Erhöhung einer endogenen  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit bewirken. Abbildung 8c zeigt, daß durch Applikation der Substanzen bei Wildtypzellen kein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^+$ -Strom induziert wurde. Weder eine Kotransfektion mit EGFP noch das verwendete Expressionssystem hatte einen funktionellen Einfluß auf die cIK1-Kanalexpression.



**Abb. 8: Vergleich von whole-cell Strömen nativer (WT) und transfizierter (cIK1) HEK293 Zellen**

- Stromantworten einer cIK1-exprimierenden und einer untransfizierten Zelle auf hyperpolarisierende und depolarisierende Spannungssprünge (Haltepotential -80 mV). Die freie  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  der Pipettenlösung betrug 1  $\mu\text{mol/l}$ . Es wurde in 5  $\text{mmol/l}$   $[\text{K}^+]_o$  abgeleitet
- Vergleich der Stromantworten von endogenen und cIK1 Strömen in HEK293-Zellen. Zur Ermittlung des Umkehrpotentials ( $U_{\text{rev}}$ ) wurden die Mittelwerte der Stromamplituden gegen das jeweilige Membranpotential aufgetragen.
- Aktivatoren  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver  $\text{K}^+$ -Kanäle induzieren keine Erhöhung der endogenen  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit in HEK293-Zellen

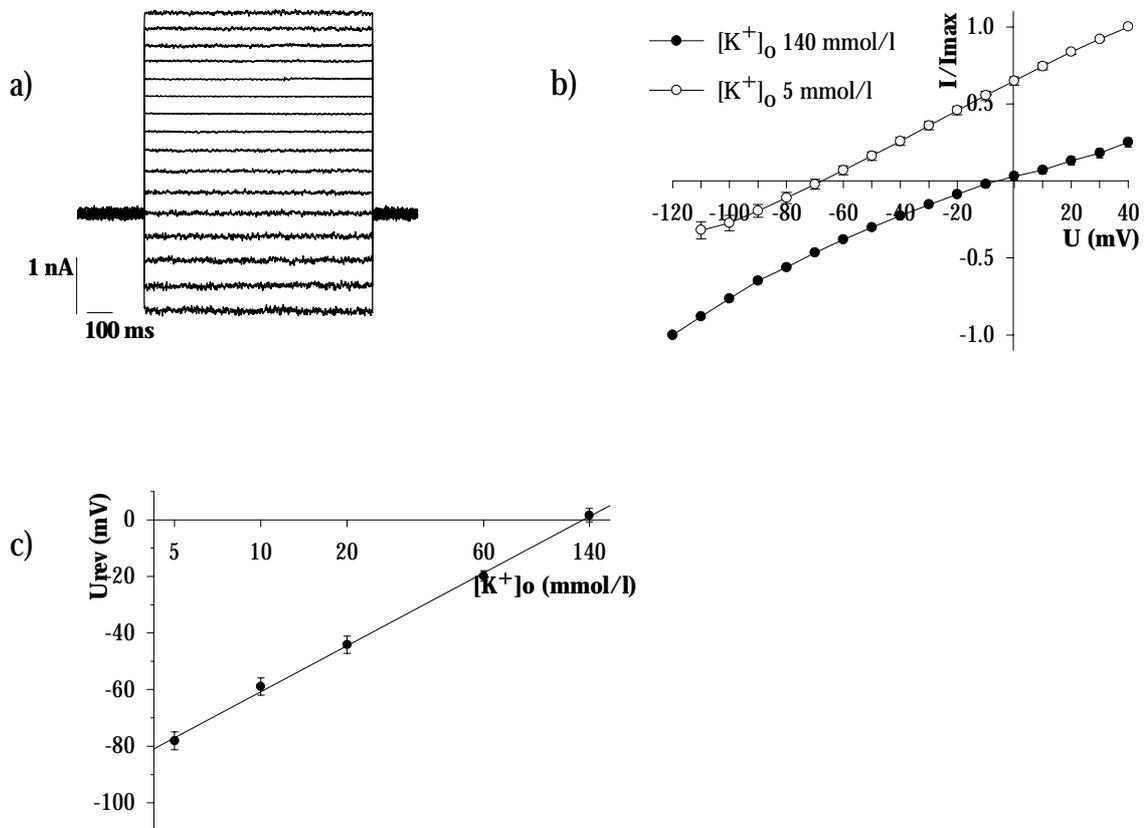
### 3.3 Elektrophysiologische Charakterisierung von cIK1 Strömen

#### 3.3.1 Untersuchungen zur Kaliumselektivität

Die elektrophysiologischen Untersuchungen der Kaliumselektivität des cIK1 aus MDCK-F-Zellen wurden in der whole-cell Konfiguration durchgeführt. Bei äquimolaren  $K^+$ -Konzentrationen und einer freien  $Ca^{2+}$ -Konzentration von  $1 \mu\text{mol/l}$  in der Pipettenlösung wurden Strom-Spannungskennlinien mit dem Standardpulsprotokoll aufgenommen. Bei cIK1 exprimierenden HEK293-Zellen wurden schwach einwärtsrektifizierende, nicht inaktivierende Ströme induziert, die im physiologischen Bereich keine Spannungsabhängigkeit aufwiesen. Abbildung 9a zeigt die Originalaufzeichnung der Stromantworten einer cIK1 exprimierenden HEK293-Zelle.

Wurden die mittleren Stromamplituden gegen das angelegte Membranpotential aufgetragen, ergibt sich bei physiologischem  $K^+$ -Gradienten ein Umkehrpotential von  $-80 \text{ mV}$ , das typisch für  $K^+$ -selektive Kanäle ist. Eine Erhöhung der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration auf  $140 \text{ mmol/l}$  resultiert in einer Verschiebung der Strom-Spannungskennlinie zu positiveren Potentialen (Abb. 9b).

Um die Abhängigkeit des Umkehrpotentials von der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration zu ermitteln, wurden Aktivierungsprotokolle bei unterschiedlichem  $K^+$ -Gradienten appliziert. Das aus den jeweiligen Strom-Spannungskurven ermittelte Umkehrpotential wurde gegen die entsprechende extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration aufgetragen. Die Mittelwerte von mindestens sechs Zellen wurden mit einer Regressionsgeraden verbunden (Abb. 9c). Die berechnete Steigung der Geraden zeigt, daß eine 10-fache Erhöhung der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration in einer Zunahme des Umkehrpotentials um  $54,9 \text{ mV}$  resultiert. Dieser Wert zeigt, daß in cIK1 exprimierenden Zellen eine überwiegende  $K^+$ -Leitfähigkeit besteht.



**Abb. 9: Kaliumselektivität der cIK1-Kanäle**

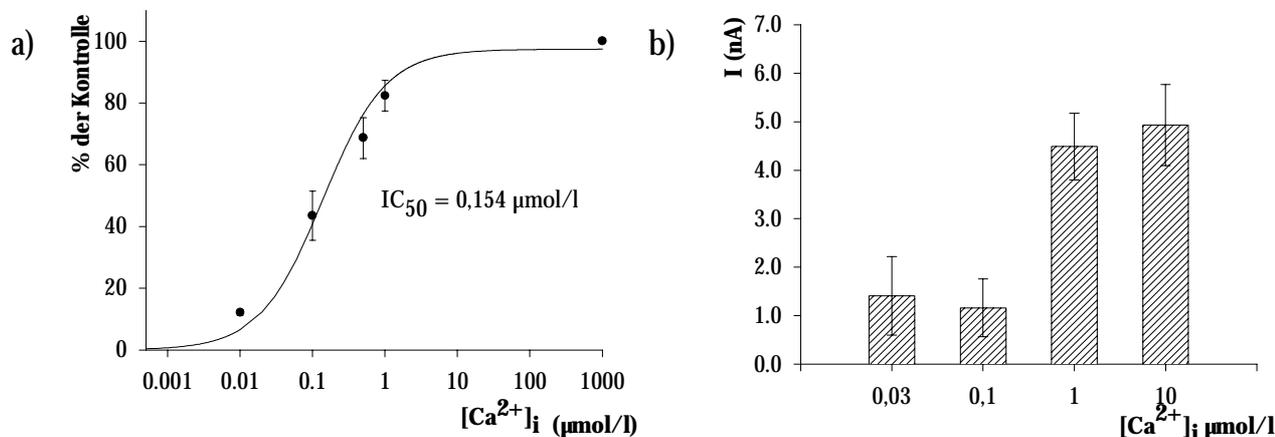
- Ganzzell-Stromantworten einer cIK1 exprimierenden HEK293-Zelle bei Membranpotentialen zwischen -120 mV und +40 mV (Haltepotential -80 mV). Die freie  $[Ca^{2+}]_i$  der Pipettenlösung betrug 1  $\mu\text{mol/l}$ . Es wurde in 140 mmol/l  $[K^+]_o$  abgeleitet
- Strom-Spannungsbeziehungen von cIK1-Strömen in 140 mmol/l und 5 mmol/l  $[K^+]_o$ . Zur Ermittlung des Umkehrpotentials wurden die Mittelwerte der Stromamplituden gegen das Membranpotential aufgetragen. Die Ströme bei physiologischem  $K^+$ -Gradienten wurden auf die Amplitude bei +40 mV normiert, die bei  $[K^+]_o = 140$  mmol/l auf die Amplitude bei -120 mV.
- Abhängigkeit des Umkehrpotentials von der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration. Das  $U_{rev}$  wurde in Lösungen mit einer  $[K^+]_o$  von 5 mmol/l, 10 mmol/l, 20 mmol/l, 60 mmol/l und 140 mmol/l ermittelt. Die Mittelwerte von jeweils mindestens 6 Zellen wurden mit einer Regressionsgerade verbunden. Die berechnete Steigung der Geraden zeigt eine Zunahme des  $U_{rev}$  um 54,9 mV bei 10-facher Erhöhung der  $[K^+]_o$ .

### 3.2.2 Abhängigkeit von der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Die Untersuchungen zur  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Regulierung des cIK1 wurden in der inside-out Konfiguration durchgeführt. Diese Konfiguration bietet den Vorteil, daß die cytoplasmatische Seite der Membran zur Badlösung, die relativ einfach während des Experimentes variiert werden kann, exponiert ist. Außerdem werden beim Herausreißen des Membranfleckes, der die zu untersuchenden Kanäle enthält, ein Großteil der Organellen und des Cytoplasmas entfernt, die  $\text{Ca}^{2+}$ -puffernde Eigenschaften aufweisen. Zur Ermittlung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität wurde die cytoplasmatische Seite des Patches mit Lösungen perfundiert, die eine freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,5 nmol/l, 0,01  $\mu\text{mol/l}$ , 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 0,5  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$ , und 1000  $\mu\text{mol/l}$  enthielten. Die bei einem Potential von +40 mV gemessenen Ströme wurden auf einen Maximalwert, der bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 1 mmol/l gemessen wurde, normiert und als Funktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufgetragen. Die Aktivierungskonstanten der Datenpunkte wurden mit der Hill-Funktion angepaßt. Abbildung 10a zeigt, daß die halbmaximale Aktivierung bei 154 nmol/l liegt.

Die in der inside-out Konfiguration ermittelten Einflüsse der intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf die Aktivierung der Kanäle konnten durch Messungen in der whole-cell Konfiguration bestätigt werden. Die in Abbildung 10b dargestellten Daten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils mindestens zehn Zellen bei freien intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von 0,03  $\mu\text{mol/l}$ , 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$  und 10  $\mu\text{mol/l}$ . In  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung konnten keine Kaliumströme induziert werden. Eine Anpassung dieser Daten an die Hill-Gleichung ergibt eine halbmaximale Aktivierung von 102 nM.

Diese Experimente belegen, daß auch beim IK1-Kanal des Hundes eine starke Abhängigkeit der Kanalaktivität von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration besteht.



**Abb.10: Vergleich der Kalziumsensitivität von cIK1-Strömen im inside-out und whole-cell patch**

- a) Inside-out Ströme wurden in einer Badlösung mit einer freien  $[Ca^{2+}]_i$  von  $0,01 \mu\text{mol/l}$ ,  $0,1 \mu\text{mol/l}$ ,  $0,5 \mu\text{mol/l}$ ,  $1 \mu\text{mol/l}$  und  $1000 \mu\text{mol/l}$  aufgenommen. Es sind die Mittelwerte der Stromamplituden von jeweils mindestens 5 Zellen dargestellt.
- b) Whole-cell Ströme wurden mit einer freien  $[Ca^{2+}]_i$  von  $0,03 \mu\text{mol/l}$ ,  $0,1 \mu\text{mol/l}$ ,  $1 \mu\text{mol/l}$  und  $10 \mu\text{mol/l}$  aufgenommen. Es sind die Mittelwerte der Stromantworten von mindestens 10 Zellen auf einen depolarisierenden Spannungspuls dargestellt.

### 3.2.3 Pharmakologische Charakterisierung

Die Ströme aller bisher beschriebenen IK1-Kanäle lassen sich aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften von anderen  $K^+$ -Kanälen unterscheiden. Sie werden durch Charybdotoxin (Rauer et al., 1998) und verschiedene Imidazolderivate, wie z.B. Clotrimazol (Alvarez et al., 1992; Wulff et al., 2000) inhibiert. Im Gegensatz dazu sind sie insensitiv gegenüber Apamin (Köhler et al. 1996), einem selektiven SK-Kanalblocker, und Iberiotoxin, einem Inhibitor von BK-Kanälen.

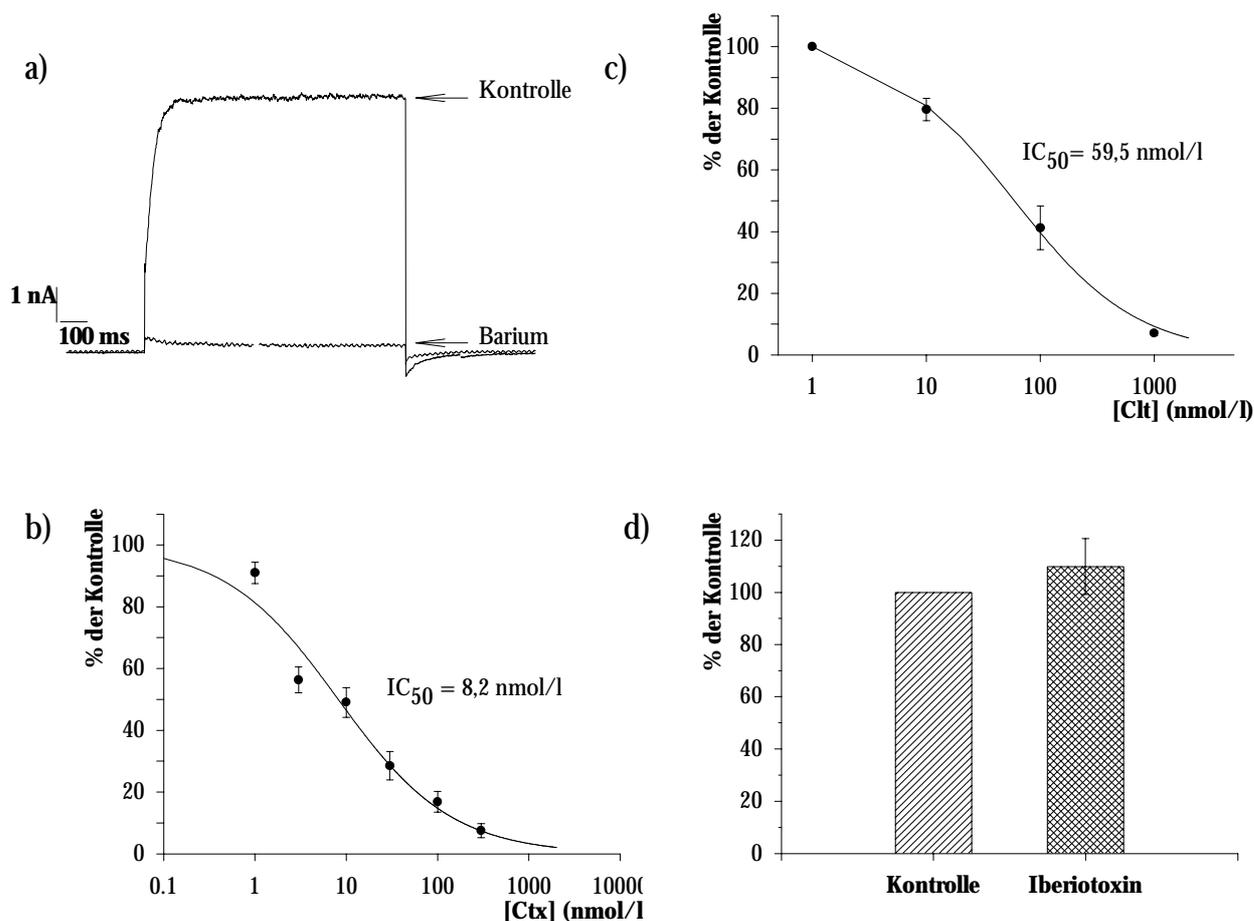
Um zu untersuchen, ob die funktionellen Eigenschaften des cIK1 denen des nativen in MDCK-Zellen exprimierten IK1-Kanals entsprechen und mit anderen Isoformen der IK1-Kanalfamilie vergleichbar sind, wurden die Wirkungen von Bariumchlorid, Clotrimazol, Charybdotoxin und Iberiotoxin untersucht.

---

In der whole-cell Konfiguration wurden mit einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  in der Pipettenlösung die Maximalamplitude der Stromantworten des cIK1 auf einen Spannungspuls auf +40 mV vor und nach Applikation der Testsubstanz ermittelt. Die Ergebnisse wurden gewonnen, nachdem sich ein Gleichgewichtsstrom eingestellt hatte. In Abhängigkeit von der Konzentration und der Wirksamkeit des Inhibitors stellte sich nach spätestens fünf Minuten (10facher Austausch des Badvolumens) ein Gleichgewichtsstrom ein. Zum Erstellen einer Dosis-Wirkungskurve wurden die gewonnenen Daten nach Applikation der Pharmaka auf den Kontrollwert normiert und als Funktion der Konzentration der Testsubstanz aufgetragen.

Der cIK1 reagiert empfindlich auf Bariumchlorid, einem unspezifischen  $\text{K}^{+}$ -Kanalblocker. Abbildung 11a zeigt die Originalaufzeichnung eines Experimentes, in dem der Einfluß von 1 mmol/ Barium auf den cIK1-Strom dargestellt ist. Bei der verwendeten Konzentration führt die Applikation von Barium zu einer vollständigen Inhibierung des Stromes. Der Kanal zeigt sich gegenüber Clotrimazol, einem relativ selektiven IK1-Kanalblocker, der ebenfalls die Aktivität von Cytochrom P450 inhibiert, sehr sensitiv. Aus Abbildung 11b ist ersichtlich, daß das Imidazolinderivat bereits bei einer Konzentration von 59,5 nmol/l zu einer Reduktion der Stromamplitude um 50% führt. Der cIK1 wurde ebenfalls durch Charybdotoxin gehemmt, welches auch die spannungsabhängigen  $\text{K}^{+}$ -Kanäle Kv1.2 (Grissmer et al., 1994), Kv1.3 (Fanger et al., 1999), Kv1.6 (Grupe et al., 1990) und hsl $\alpha$  (Garcia et al., 1995) blockiert. In Abbildung 11c ist die Dosis-Wirkungskurve von Charybdotoxin dargestellt. Die halbmaximale Inhibierungskonstante beträgt 8,2 nmol/l.

Als Negativkontrolle wurde der für BK-Kanäle spezifische Inhibitor Iberiotoxin appliziert. 100 nmol/l Iberiotoxin haben keinen Einfluß auf die Aktivität von IK1-Kanälen.

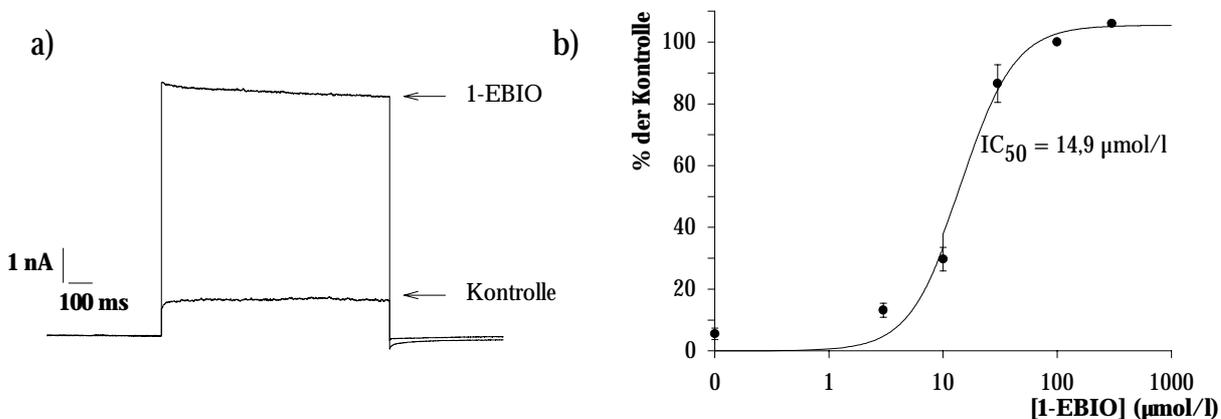


**Abb.11: Wirkung von Barium, Clotrimazol, Charbdotoxin und Iberiotoxin auf die Aktivität der cIK1-Kanäle**

- Ganzzell Ströme vor und nach Appliation von Barium. 1mmol/l  $[Ba^{2+}]_o$  inhibiert Stromantworten des cIK1 auf einen Spannungspuls von +40 mV vollständig.
- Clotrimazol blockiert den cIK1 mit einer halbmaximalen Inhibierungskonstante von 59,5 nmol/l
- Charybdotoxin blockiert den cIK1 mit einer halbmaximalen Inhibierungskonstante von 8,2 nmol/l.
- 100 nM Iberiotoxin beeinflusst die Kanalaktivität des cIK1 nicht

Neben der Hemmbarkeit durch die beschriebenen Inhibitoren lassen sich IK1-Kanäle durch 1-Ethyl-2-Benzimidazolone (1-EBIO) aktivieren. 1-EBIO ist der erste beschriebene Aktivator von klonierten hIK1-Kanälen (Skaaning et al., 1998) und gilt als klassischer Modulator der Kanalaktivität nativer IK1-Kanäle (Bridges et al., 1997).

In der whole-cell Konfiguration wurde mit einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $0,1 \mu\text{mol/l}$  in der Pipetenlösung die Maximalamplitude der Stromantworten des cIK1 vor und nach Applikation von 1-EBIO ermittelt. Abbildung 12a zeigt die Stromantworten einer HEK293-Zelle auf einen depolarisierenden Testpuls vor und nach Applikation der Substanz. Die durch 1-EBIO induzierte Aktivität erfolgte innerhalb weniger Sekunden und ließ sich vollständig auswaschen. Die resultierenden Ströme waren einwärtsrektifizierend, spannungsunabhängig und zeigten keine Inaktivierungskinetik. Sie ließen sich sowohl durch Charybdotoxin als auch durch Clotrimazol blockieren. Um eine Dosis-Wirkungskurve zu erstellen, wurden die Gleichgewichtsströme nach Applikation von  $1 \mu\text{mol/l}$ ,  $3 \mu\text{mol/l}$ ,  $10 \mu\text{mol/l}$ ,  $100 \mu\text{mol/l}$  und  $300 \mu\text{mol/l}$  1-EBIO aufgenommen und auf den Kontrollwert normiert. Abbildung 12b zeigt, daß 1-EBIO eine konzentrationsabhängige Aktivierung mit einer halbmaximalen Aktivierungskonstante von  $14,5 \mu\text{mol/l}$  induziert.



**Abb.12: Wirkung von 1-Ethyl-2-Benzimidazolinon (1-EBIO) auf die Aktivität der cIK1-Ströme**

- a) Ganzzell-Ströme vor und nach Applikation von  $300 \mu\text{mol/l}$  1-EBIO  
 b) Ganzzell-Ströme wurden mit einer freien  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von  $0,1 \mu\text{mol/l}$  aufgenommen. Gleichgewichtsströme wurden nach Applikation von  $1 \mu\text{mol/l}$ ,  $3 \mu\text{mol/l}$ ,  $10 \mu\text{mol/l}$ ,  $30 \mu\text{mol/l}$ ,  $100 \mu\text{mol/l}$  und  $300 \mu\text{mol/l}$   $[\text{EBIO}]_o$  aufgenommen. 1-EBIO steigert die Aktivität von  $\text{K}^+$ -Kanälen, die vor Applikation des Aktivators mit Strömen von  $<1 \text{ nA}$  auf depolarisierende Testpulse reagierten, mit einer halbmaximalen Wirkkonstante von  $14,9 \mu\text{mol/l}$ .

Die Untersuchungen zeigen, daß 1-EBIO die Kanalaktivität stimuliert, ohne dabei die funktionellen Eigenschaften des Stromes zu verändern. Im Gegensatz zu bisher beschriebenen IK1-Kanälen wirkt 1-EBIO bereits bei einer Konzentration von 14,9  $\mu\text{mol/l}$ . Eine aktivierende Wirkung konnte ebenfalls beim nativen cIK1 in MDCK-Zellen beobachtet werden. In den folgenden Experimenten wurde 1-EBIO als Kontrollsubstanz eingesetzt, um die cIK1-Expression bei solchen Zellen zu überprüfen, bei denen eine Testsubstanz keine aktivierende Wirkung auf die Kanäle zeigte.

Die elektrophysiologische Charakterisierung des klonierten cIK1 zeigt, daß die funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften denen des nativen Kanals in MDCK-Zellen entsprechen und mit denen anderer Mitglieder der IK1-Kanalfamilie übereinstimmen. Die Tabelle 1 zeigt eine Gegenüberstellung der funktionellen Eigenschaften des klonierten cIK1 mit ausgewählten Literaturdaten klonierter Isoformen des Menschen, der Ratte und der Maus.

Isoform	cIK1	hIK1	hIK1	hIK1	hIK1	rIK1	mIK1
Gewebe	Niere	Placenta	Lymphocyten	Lymphocyten	Pankreas	glatter Muskel	Erythroblasten
Expressionssystem	HEK293	HEK293	HEK293	CHO	Oocyten	Oocyten	Oocyten
Literatur		Skaaning et al., 1998	Logsdon et al., 1997	Khanna et al., 1999	Ischii et al., 1997	Craig et al., 1999	Vandorpe et al., 1998
$U_{\text{rev}}(\text{K}^+)$	55 mV		57 mV		58 mV	60 mV	
$\text{Ca}^{2+}$ ( $\text{EC}_{50}$ )	154 nM	100 nM	270 nM		300 nM	120 nM	158 nM
Clt ( $\text{IC}_{50}$ )	60 nM	150 nM	387 nM	50 nM	25 nM		14 nM
Ctx ( $\text{IC}_{50}$ )	8 nM	28 nM	10 nM	2 nM	3 nM	10 nM	4 nM
EBIO ( $\text{EC}_{50}$ )	15 $\mu\text{M}$	74 $\mu\text{M}$	① 30 $\mu\text{M}$			② 84 $\mu\text{M}$	

**Tab. 1: Gegenüberstellung der Eigenschaften klonierter IK1-Kanäle**

(Erläuterungen siehe Text) Clt = Clotrimazol, Ctx = Charybdotoxin,  $U_{\text{rev}}(\text{K}^+)$  = Änderung des Umkehrpotentials bei 10-facher Erhöhung der  $\text{K}^+$ -Konzentration, ①Pedersen et al., 1999, ②Syme et al., 2000

Alle  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierten  $\text{K}^+$ -Kanäle mittlerer Leitfähigkeit zeigen eine reine  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit, sind bei äquimolaren  $\text{K}^+$ -Konzentrationen einwärtsrektifizierend und im physiologischen Bereich durch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reguliert. Pharmakologisch lassen

---

sich alle IK1-Kanäle durch Clotrimazol, Charybdotoxin blockieren und durch 1-EBIO aktivieren. Unterschiede hinsichtlich der Aktivierungs- bzw. Inhibierungskonstanten sind auf das jeweilige Expressionssystem und oder die Gewebsspezifität der Kanalisformen zurückzuführen.

### **3.4 Untersuchungen zur Phosphorylierung des cIK1**

Neben einer Regulierung der Kanalaktivität durch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration konnte sowohl für den nativen cIK1 aus MDCK-Zellen als auch für klonierte IK1-Kanalisformen gezeigt werden, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität dieser Kanäle durch Phosphorylierungsreaktionen moduliert wird. Verschiedene Untersuchungen zeigen, daß eine ATP-abhängige Aktivierung der Kanalaktivität durch exogene Phosphatasen und Kinaseinhibitoren gehemmt werden konnte. In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob eine Phosphorylierung durch die Proteinkinasen A oder C die Aktivität des klonierten cIK1 moduliert.

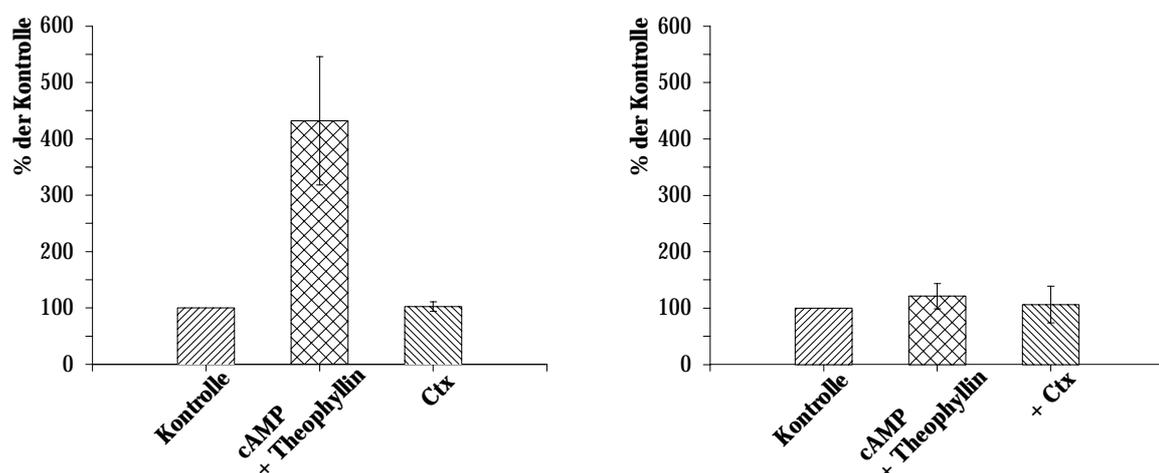
#### **3.4.1 Regulierung durch die cAMP bzw. cGMP abhängige Proteinkinase (PKA)**

Im Gegensatz zum cIK1 enthält die Aminosäuresequenz aller bisher klonierten Isoformen der IK1-Kanäle im proximalen Bereich des C-Terminus eine putative Phosphorylierungsstelle für die cAMP- oder cGMP-abhängige Proteinkinase (PKA). Untersuchungen am hIK1 zeigten, daß eine phosphorylierungsabhängige Regulierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität auf die Aktivierung der Proteinkinase A zurückzuführen ist. So konnte eine ATP-abhängige Modulation der Kanalaktivität durch den PKA-Inhibitor PKI<sub>5-24</sub> gehemmt werden (Gerlach et al., 2000). Auch beim nativen hIK1 aus humanen Erythrocyten konnte durch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration eine Steigerung der  $\text{K}^+$ -Kanalaktivität induziert werden (Pellegrino, Pellegrini, 1998).

Um zu untersuchen, ob das Fehlen dieser konservierten Phosphorylierungsstelle die Regulierung der Kanalaktivität des cIK1 beeinflusst, wurde der intrazelluläre cAMP-Spiegel bei gleichzeitiger Hemmung der Phosphodiesterase erhöht. Um einen direkten Vergleich der Regulierung von cIK1 und hIK1 zu ermöglichen, wurden beide Isoformen untersucht.

Innerhalb weniger Minuten nach Behandlung der Zellen mit dem membrangängigen 8-bromo-cAMP und dem Phosphodiesterase-Hemmstoff Theophyllin konnte beim hIK1 ein Anstieg der Kanalaktivität ( $4,3 \pm 1,1$ -fach) beobachtet werden, der sich durch Clotrimazol hemmen ließ (Abb. 13a). Im Gegensatz dazu konnte bei der Hundeisoform (cIK1) keine Erhöhung ( $1,2 \pm 0,2$  fach) der  $K^+$ -Leitfähigkeit durch Stimulierung der Proteinkinase A ausgelöst werden (Abb. 13b).

Diese Daten zeigen, daß das Fehlen einer putativen PKA-Phosphorylierungsstelle die Sensitivität gegenüber Theophyllin beeinflusst. Ähnlich wie beim nativen Kanal aus MDCK-Zellen verändert eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration die Kanalaktivität des heterolog exprimierten cIK1 in HEK293-Zellen nicht.



**Abb.13: Wirkung der PKA-Stimulierung auf die Aktivität der IK1-Kanäle**

- Stimulierung der PKA mit 1 mmol/l 8-bromo-cAMP und 1 mmol/l Theophyllin führt zu einer 4,3-fachen Steigerung der Kanalaktivität des hIK1
- Stimulierung der PKA beeinflusst die Kanalaktivität des cIK1 nicht

### 3.4.2 Regulierung des cIK1 durch die Proteinkinase C (PKC)

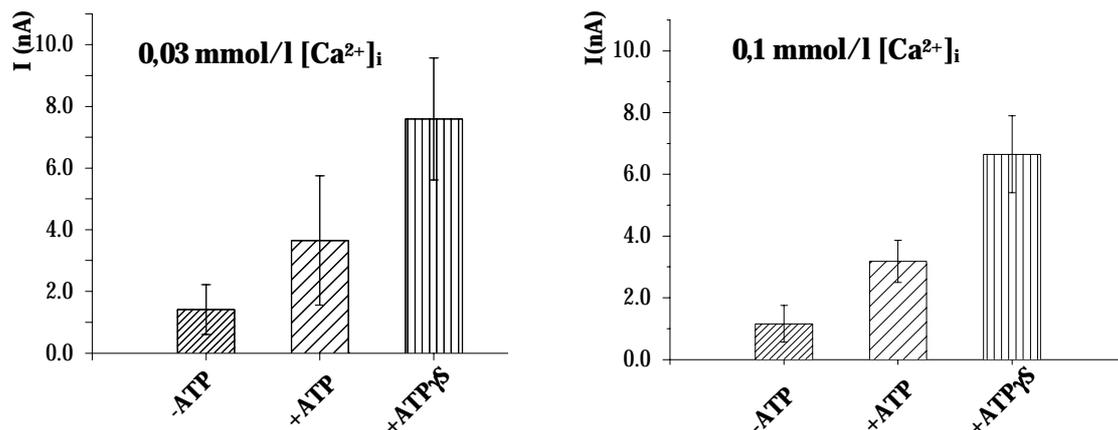
Die Proteinkinase C (PKC) ist eine Serin-Threonin-Kinase, die eine Vielzahl intrazellulärer Prozesse reguliert und eine zentrale Rolle bei der intrazellulären Signalübertragung spielt (Ron und Kazanietz, 1999). Sie ist eines der wichtigsten intrazellulären Enzyme, daß u.a. durch Phosphorylierung die Aktivierung von Ionenkanälen reguliert oder deren Regulierung modifiziert. Die PKC überträgt nach ihrer Aktivierung durch Diacylglycerin und  $\text{Ca}^{2+}$  die terminale Phosphatgruppe von ATP auf spezielle Serin- und Threoninreste von Zielproteinen. Die Aminosäuresequenz des cIK1 enthält drei putative Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C.

Am nativen cIK1 aus MDCK-Zellen zeigte sich ein extremer Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität nach Stimulierung der PKC. Eine ATP-abhängige Regulierung, die durch Phosphatasen blockiert werden konnten, weisen auch bei anderen IK1-Kanalisoformen auf eine Modulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierten Kanalaktivität durch Proteinkinasen hin.

Um zu überprüfen, ob der klonierte cIK1 in ähnlicher Weise eine Sensitivität gegenüber ATP zeigt, wurden die Intrazellulärlösungen durch Zusatz von 1 mmol/l ATP oder 2 mmol/l  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  modifiziert.  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  ist ein Analogon des ATP, das in verschiedenen Reaktionen ATP ersetzen kann. Die mit  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  durchgeführten Phosphorylierungen sind jedoch weitgehend resistent gegenüber Proteinphosphatasen. Nach Äquilibration der Zellen mit der entsprechenden Pipettenlösung wurden die in der whole-cell-Konfiguration gemessenen Stromantworten bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen unterhalb des halbmaximalen Aktivierungswertes (0,1  $\mu\text{mol/l}$  und 0,03  $\mu\text{mol/l}$ ) verglichen.

In Abbildung 14 sind die Mittelwerte der spontanen Stromantworten von mindestens 8 Zellen bei einer freien intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0,03  $\mu\text{mol/l}$   $\text{Ca}^{2+}$  (0,1  $\mu\text{mol/l}$   $\text{Ca}^{2+}$ ) dargestellt. Die durchschnittliche Stromamplitude der Zellen, die mit ATP-freier Intrazellulärlösung äquilibriert wurden, betrug  $1,41 \pm 0,81$  nA ( $1,16 \pm 0,59$  nA). 30% (27%) der Zellen beantworteten den Trespuls mit Strömen  $>1$  nA. In Gegenwart von 1 mmol/l ATP reagierten 56% (53%) der Zellen mit einem  $\text{K}^+$ -Strom von  $>1$  nA. Die mittlere Stromamplitude betrug  $3,65 \pm 2,10$  nA ( $3,18 \pm 0,69$  nA). Im Vergleich zu den Messungen mit ATP-freier Pipettenlösung führt die Zugabe von 2 mmol/l  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  zu einem signifikanten Anstieg der cIK1-Aktivität. 83% (100%) der Zellen reagierten mit

Strömen, die eine durchschnittliche Amplitude von  $7,59 \pm 2,00$  nA ( $6,65 \pm 1,25$  nA) aufwiesen.



**Abb.14: Einfluß von ATP und ATP $\gamma$ S auf die Kanalaktivität des cIK1**

Vergleich der Stromantworten auf einen depolarisierenden Spannungspuls bei einer freien  $[Ca^{2+}]_i$  von  $0,03 \mu\text{mol/l}$  und  $0,1 \mu\text{mol/l}$ . Zusatz von ATP bzw. ATP $\gamma$ S zur Intrazellulärlösung induziert einen signifikanten Anstieg der spontanen Kanalaktivität des cIK1.

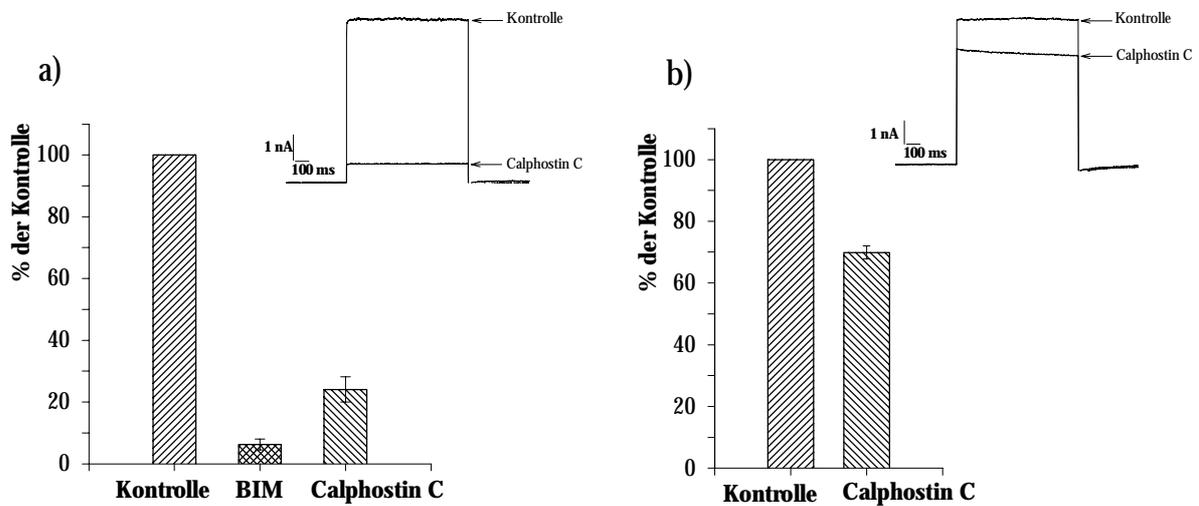
Diese Ergebnisse zeigen, daß ATP einen Anstieg der Kanalaktivität bei  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen bewirkt, die unter denen liegen, bei denen der Kanal ohne ATP halbmaximal aktiviert wird. Diese  $Ca^{2+}$ -unabhängige Aktivierung spiegelt sich nicht nur in einer durchschnittlich höheren Stromamplitude, sondern auch in einer prozentualen Häufung der Zellen mit aktiven Kanäle wieder. Eine mögliche Ursache für diese Stimulierung liegt in einer PKC-abhängigen Phosphorylierung des Kanalproteins oder eines assoziierten Proteins. Um eine Beteiligung der PKC an dieser Aktivierung festzustellen, wurden ATP-induzierte Ströme durch die spezifischen Inhibitoren Bisindolylmaleimid (BIM) und Calphostin C blockiert.

### 3.4.2 Hemmbarkeit des ATP induzierten Stroms

Bisindolylmaleimid (BIM) ist ein selektiv wirkender, membranpermeabler Hemmstoff der Proteinkinase C ( $K_i = 10 \text{ nmol/l}$ ), der an die ATP-Bindungsdomäne bindet. Calphostin C ( $K_i = 50 \text{ nmol/l}$ ) interagiert mit der regulatorischen Untereinheit der PKC und verhindert so die Bindung von Diacylglycerol (DAG) und Phorbolestern. Die Verwendung beider Substanzen bot außerdem die Sicherheit, daß eine Hemmung der Kanalaktivität nicht auf eine direkte Kanalblockierung zurückzuführen ist.

Die Versuche wurden mit einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $0,1 \text{ } \mu\text{mol/l}$  mit  $1 \text{ mmol/l}$  ATP in der Pipettenlösung durchgeführt. Es wurden nur Zellen ( $n = 8$  bzw.  $6$ ) mit den Testsubstanzen superfundiert, die nach Äquilibration mit der Pipettenlösung Stromamplituden von  $>1 \text{ nA}$  aufwiesen. In Abbildung 15a ist der nach Applikation der PKC-Hemmstoffe verbleibende Strom als Prozent der Kontrolle dargestellt. Sowohl BIM als auch Calphostin C inhibierten die durch einen Testpuls induzierten Stromantworten reversibel. Innerhalb der ersten drei Minuten führte die Applikation von  $0,1 \text{ } \mu\text{mol/l}$  BIM zu einer signifikanten Reduktion der Stromamplitude auf  $4 \pm 2\%$ , die von  $0,1 \text{ } \mu\text{mol/l}$  Calphostin C auf  $24 \pm 4\%$  des jeweiligen Kontrollwertes.

Zur Kontrolle wurden auch die Zellen mit Calphostin C superfundiert, bei denen der cIK1 mit  $2 \text{ mmol/l}$   $\text{ATP}\gamma\text{S}$  aktiviert war. In Abbildung 15b sind die verbleibenden Ströme als Prozent der Kontrolle aufgetragen. Nach 10-minütiger Superfusion (20-facher Austausch des Badvolumens) reduziert Calphostin C die Stromamplituden auf  $70 \pm 2\%$  des jeweiligen Kontrollwertes. Diese Hemmung ist signifikant schwächer ausgeprägt als die in Gegenwart von ATP erzielte Inhibierung der Ströme. Die deutlich geringere Wirkung des PKC-Inhibitors bei  $\text{ATP}\gamma\text{S}$ -stimulierten cIK1-Strömen ist auf die fast irreversible Phosphorylierung durch  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  zurückzuführen.



**Abb.15: Hemmbarkeit ATP induzierten Stroms durch selektive PKC-Inhibitoren**

- a) In Gegenwart von 1 mmol/l ATP wird die Kanalaktivität durch die PKC-Inhibitoren Bisindolymaleimid (BIM) und Calphostin C gehemmt.
- b) 2 mmol/l ATP $\gamma$ S in der Pipettenlösung verhindert die Hemmung der Kanalaktivität durch PKC-Inhibitoren

Die Daten sprechen dafür, daß die in Gegenwart von ATP gemessenen Ströme auf eine Aktivierung der PKC zurückzuführen sind. Eine Inhibierung der Kanalaktivität durch eine direkte Blockierung des Kanals konnte ausgeschlossen werden, da strukturell nicht verwandte Substanzen die Kanalaktivität inhibieren. Auch die stark geminderte Hemmbarkeit ATP $\gamma$ S-induzierter cIK1-Ströme widerspricht einer direkten Blockierung durch die PKC-Inhibitoren. Die ungleiche Effektivität von BIM und Calphostin C ist auf die unterschiedlichen Inhibierungskonstanten beider Substanzen zurückzuführen.

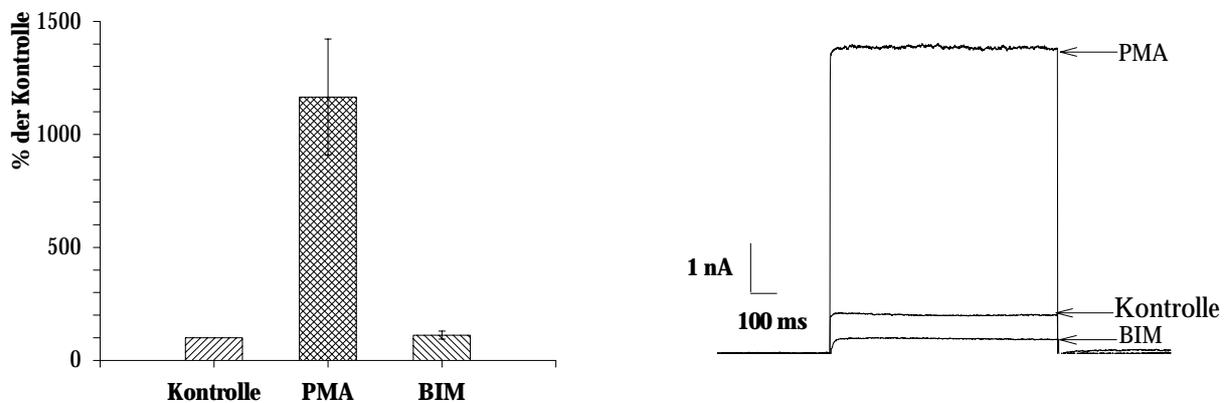
### 3.4.3 Aktivierung der PKC

Die Hemmung der PKC durch BIM und Calphostin C führt zu einer Inhibierung der Kanalaktivität des cIK1. Um zu überprüfen, ob eine direkte Aktivierung der PKC zu einer Stimulierung der Kanalaktivität führt, wurden die den cIK1-exprimierenden Zellen kurzfristig mit einem Phorbolster stimuliert. Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) bindet reversibel an die regulatorische Untereinheit der PKC (Ono, Y. et al., 1989, Sharkey, N. et al. 1984) und führt innerhalb von 2 Minuten zu einer Aktivierung der PKC (Dunne, 1994; Tepper et al., 1995; Taguchi et al., 2000).

Die Versuche wurden mit einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $0,1 \mu\text{mol/l}$  und  $1 \text{ mmol/l}$  ATP in der Pipettenlösung durchgeführt. Es wurden nur Zellen mit  $0,1 \mu\text{mol/l}$  PMA superfundiert, die nach Äquilibration mit der Pipettenlösung keine Kanalaktivität zeigten. Um zu überprüfen, ob eine PKC-Phosphorylierung die Aktivierung eines  $\text{K}^+$ -Stromes induziert, wurden durch Anwendung der Aktivierungsprotokolle Strom-Spannungskennlinien ermittelt. Mit 1-EBIO wurde ausgeschlossen, daß ein Ausbleiben der Kanalaktivierung auf eine fehlende Expression des cIK1 in diesen Zellen zurückzuführen war. Nur eindeutig transfizierte Zellen wurden in die Wertung einbezogen.

In Abbildung 16 sind die Stromamplituden der nach Stimulierung mit PMA aktivierten Zellen ( $n = 12$ ) als Prozent der Kontrolle dargestellt. Die Aktivierung der  $\text{K}^+$ -Ströme erfolgte innerhalb von 5 Minuten. Es kam im Durchschnitt zu einer 12-fachen Steigerung der Stromamplitude. Die durch die PKC-Aktivierung induzierten Ströme ließen sich sowohl durch BIM als auch durch Calphostin C vollständig inhibieren. Die durch PMA induzierte Kanalaktivität konnte sowohl in CHO- als auch in HEK293-Zellen beobachtet werden.

Bei den Experimente mit akuter PMA-Stimulierung konnten drei Reaktionscharakteristiken unterschieden werden. Ca. 50% der Zellen reagierten bereits direkt nach dem Erreichen der Ganzzell-Konfiguration mit einer Stromantwort von  $>1 \text{ nA}$  (3.4.2, s.S. 54). 20% der Zellen mit Stromamplituden von  $<1 \text{ nA}$  zeigten eine starke Reaktion auf PMA. Die restlichen Zellen ließen zwar nicht durch PMA aktivieren, reagierten aber nach Applikation von 1-EBIO mit einem Anstieg ihrer  $\text{K}^+$ -Kanalaktivität.



**Abb.:16 Akute Aktivierung der PKC mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)**

Kurzzeitige Stimulierung der PKC mit PMA führt zu einem signifikanten Anstieg der Kanalaktivität, der sich durch BIM blockieren läßt

Die Daten liefern einen weiteren Hinweis dafür, daß der cIK1 durch eine akute Stimulierung der PKC aktiviert wird. Die phosphorylierungsbedingte Regulierung der Kanalaktivität des cIK1 ist unabhängig vom Expressionssystem.

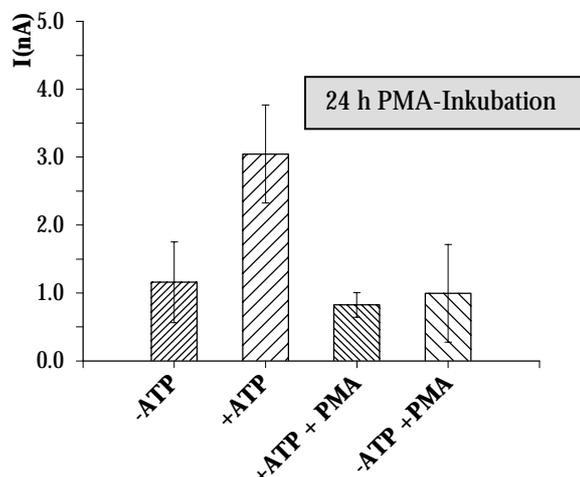
### 3.4.4 Langzeitstimulierung mit Phorbolestern

Um ausschließen zu können, daß die Stimulierung der Kanalaktivität auf eine direkte Interaktion der Kanäle mit PMA zurückzuführen ist, wurde die Effektivität des Phorbolesters mit einer Langzeitstimulierung der Zellen überprüft. Eine 24-stündige Inkubation der Zellen mit  $0,1 \mu\text{M}$  PMA führt zu einem fast vollständigen Abbau von PKC-Molekülen. Die PKC-Enzymaktivität in diesen Zellen sinkt auf  $<10\%$  der Ursprungsaktivität (Krug et al., 1987; 1987). Unter diesen Bedingungen kann eine durch eine PKC-Phosphorylierung induzierte Aktivierung der cIK1 Kanalströme nicht mehr erfolgen.

Die Versuche wurden mit  $0,1 \mu\text{mol/l}$  freiem  $\text{Ca}^{2+}$  in der Pipettenlösung durchgeführt. Die Perfusionslösung enthielt  $0,1 \mu\text{mol/l}$  PMA. Nach einer 24-stündigen Inkubation der

Zellen mit PMA reagierten weniger als 20% der untersuchten Zellen mit einer Stromantwort ( $>1$  nA) auf einen Testpuls. Die durchschnittliche Stromamplitude betrug in ATP-freier Pipettenlösung  $0,9 \pm 0,5$  nA. Der Zusatz von ATP zur Intrazellulärlösung hatte keinen Einfluß auf die cIK1-Kanalaktivität ( $0,8 \pm 0,2$  nA). Die Superfusion der Zellen mit 1-EBIO führte bei diesen Experimenten zu einer Aktivierung der cIK1-Kanäle.

Die durchschnittliche Stromamplitude der Kanäle betrug während der Kontrolluntersuchungen bei unveränderter PKC-Aktivität in Gegenwart von 1 mmol/l ATP 3,18 nA. 53% aller Zellen beantworteten den Testpuls mit Strömen  $>1$ nA, die sich durch BIM oder Calphostin C hemmen ließen. Während der Messungen, die mit ATP-freier Pipettenlösung durchgeführt wurden, waren 27% der Zellen aktiviert (3.4.2, s.S. 54). In Abbildung 17 sind die durchschnittlichen Stromamplituden der cIK1-Kanäle vor und nach Übernachtinkubation der Zellen mit PMA dargestellt.



**Abb.17: Inaktivierung der PKC beeinflusst die ATP-Sensitivität der Zellen**

Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit PMA erfolgt keine durch ATP induzierte Erhöhung der Kanalaktivität. führt zu einer Inhibierung der PKC. Die ATP-abhängige Stimulierung der Kanalaktivität während der Kontrolluntersuchungen ist auf eine PKC-Phosphorylierung zurückzuführen.

Diese Ergebnisse bestätigen, daß der durch kurzzeitige Superfusion der Zellen mit PMA induzierte Anstieg der Kanalaktivität (3.4.3, s.S. 58) auf eine Stimulierung der PKC zurückzuführen ist. Die Inaktivierung der PKC verhindert die in Gegenwart 1 mmol/l ATP beobachtete Erhöhung Kanalaktivität des cIK1. Die Expression der Kanäle oder deren Transport in die Membran wird durch eine langfristige Inhibierung der PKC nicht beeinflusst.

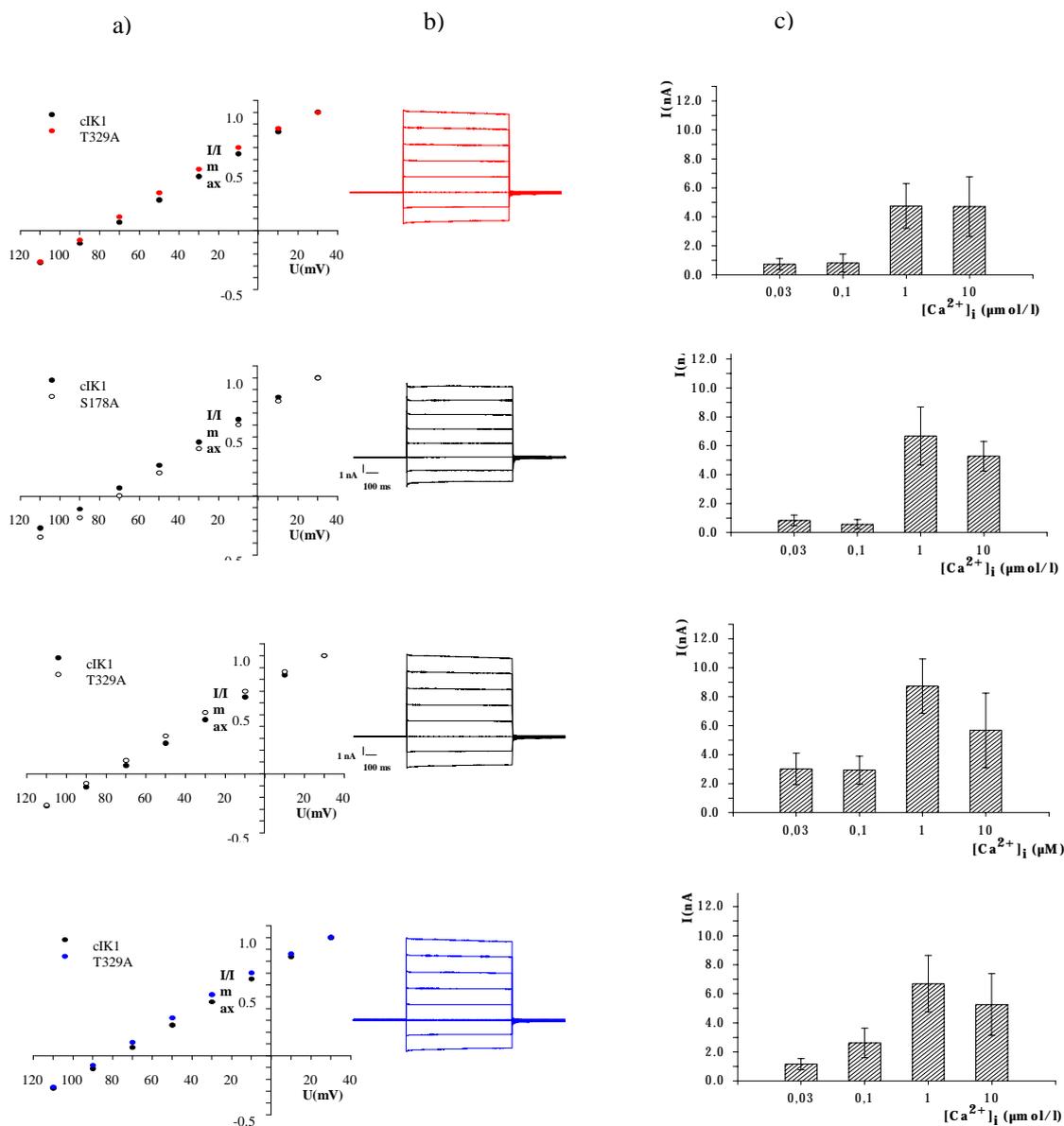
### 3.5 Mutation der PKC-Phosphorylierungsstellen

Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob der cIK1 von der PKC direkt phosphoryliert (und damit reguliert) wird, oder ob er indirekt über andere noch nicht identifizierte Proteine reguliert wird.

Der cytoplasmatische Bereich der Aminosäuresequenz des cIK1 enthält drei mögliche Konsensussequenzen für eine Phosphorylierung durch die PKC (S/TXR) bei Threonin101, Serin178 und Threonin329. Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden diese PKC-Phosphorylierungsstellen so verändert, daß eine Phosphorylierung des cIK1-Kanalproteins dort nicht mehr erfolgen konnte. Dazu wurden die Threonine an den Stellen T101 und T329 und das Serin S178 durch Alanin ersetzt. Um ausschließen zu können, daß nur die gleichzeitige Phosphorylierung aller drei Stellen oder deren Interaktion die Kanalaktivität beeinflusst, wurde zusätzlich eine Dreifachmutation erstellt, die keine PKC-Phosphorylierungsstellen enthält.

#### 3.5.1 Untersuchung der Mutanten auf Funktionalität

Die cDNA aller vier Kanalmutanten wurde stabil in HEK293 Zellen exprimiert und hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften charakterisiert und mit dem Wildtyp cIK1 verglichen. Die Untersuchungen ihrer elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften wurden in der whole-cell Konfiguration der Patch-Clamp Technik durchgeführt. Die mit einer freien intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  gemessenen Ströme aller vier Mutanten des cIK1 waren schwach einwärtsrektifizierend, zeigten keine Inaktivierungskinetik und wiesen im physiologischen Bereich keine Spannungsabhängigkeit auf (Abb.18). Die Ströme ließen sich sowohl durch Clotrimazol und Charybdotoxin blockieren als auch durch 1-EBIO aktivieren. Die PKC defizienten Mutanten wiesen eine starke Abhängigkeit der Kanalaktivität von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf (Abb. 18). Bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen der Pipettenlösung von 30 nmol/l und 100 nmol/l fielen die Ströme der Mutanten T329A und der Dreifachmutante T101/S178/T329A aufgrund ihrer erhöhten Stromamplituden auf.



**Abb.18: Vergleich der K<sup>+</sup>-Selektivität und Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität der vier untersuchten cIK1-Mutanten**

- a) Vergleich der Strom-Spannungsbeziehungen von Strömen des cIK1 und der Kanalmutanten. Zur Ermittlung des Umkehrpotentials wurden die Mittelwerte der Stromamplituden gegen das jeweilige Membranpotential aufgetragen
- b) Originalaufzeichnung der Ganzzell-Stromantworten der die Mutanten exprimierenden HEK293-Zellen
- c) Mittelwerte der Stromamplituden von mindestens 6 Zellen bei freien intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$  von 0,03  $\mu$ mol/l, 0,1  $\mu$ mol/l, 1  $\mu$ mol/l und 10  $\mu$ mol/l

Die Daten zeigen, daß Punktmutationen innerhalb der putativen Konsensussequenz für eine Phosphorylierung durch die PKC die Funktionalität des cIK1 nicht beeinflussen. Die Kanalmutanten weisen gegenüber dem Wildtyp cIK1 keine Unterschiede ihrer pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften auf. Aufgrund ihrer durchschnittlich höheren Stromamplitude unterschied sich die cIK1-Mutante T329A vom Wildtyp cIK1.

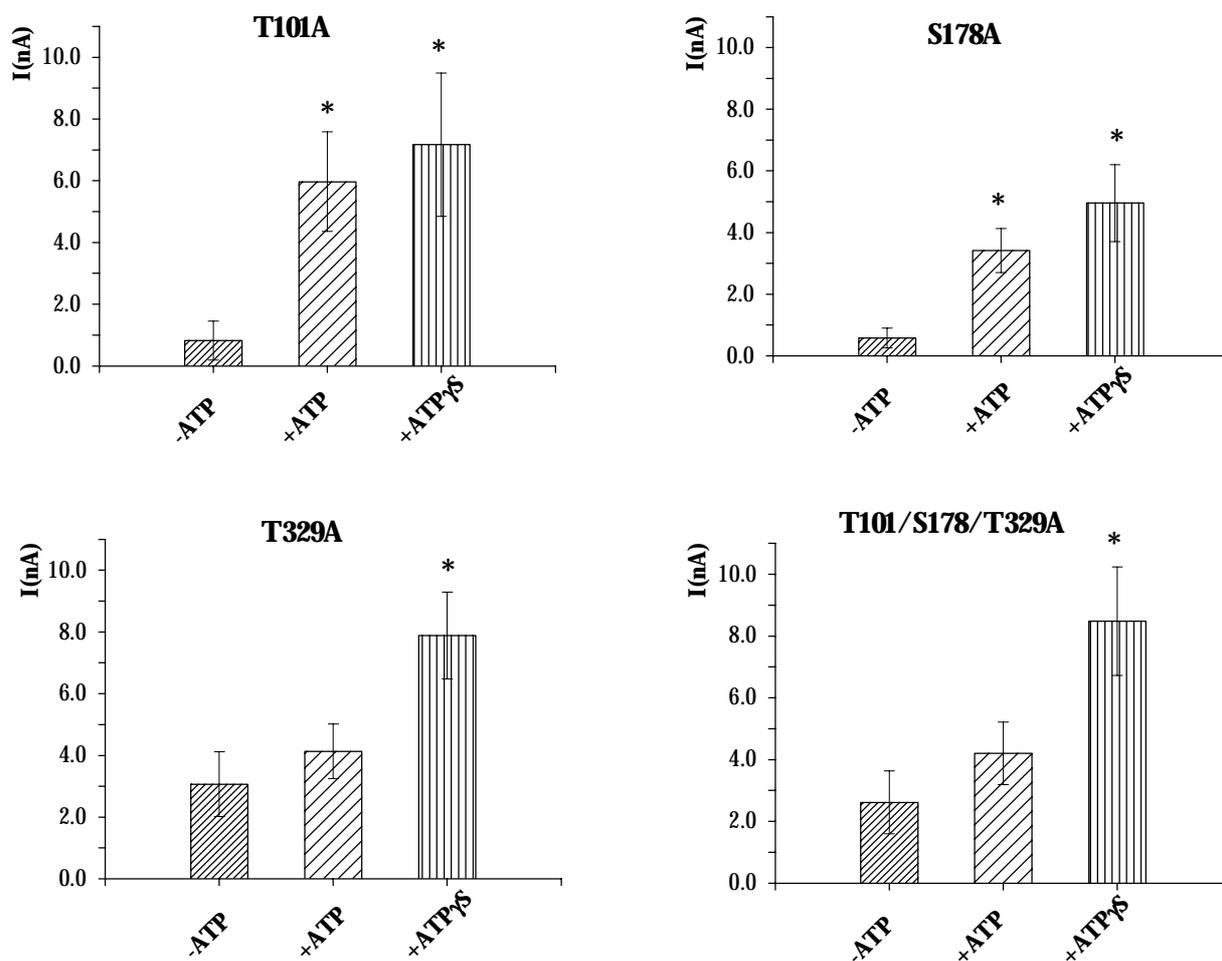
### 3.5.2 Regulierung durch die Proteinkinase C

ATP bewirkt beim cIK1 einen  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Anstieg der Kanalaktivität. Diese ATP-gebundene Aktivierung konnte auf eine PKC-Phosphorylierung zurückgeführt werden. Um zu überprüfen, ob Mutationen der potentiellen Phosphorylierungsstellen die Regulierung der Kanalaktivität durch die PKC beeinflussen, wurde die ATP-Empfindlichkeit der Kanalmutanten untersucht (3.4.2, s.S. 54). Zu diesem Zweck wurden die mit einer ATP-freien Pipettenlösung induzierten Ströme der Kanalmutanten mit den Stromantworten verglichen, die in Gegenwart von 1 mmol/l ATP und 2 mmol/l ATP $\gamma$ S gemessen wurden ( $[\text{Ca}^{2+}]_i = 0,1 \mu\text{mol/l}$ ) (Abb. 19).

In ATP-freier Lösung betrug die durchschnittliche Stromamplitude der cIK1-Mutanten T101A und S178A  $0,82 \pm 0,63 \text{ nA}$  bzw.  $0,58 \pm 0,31 \text{ nA}$ . 17% bzw. 11% der untersuchten Zellen hatten Stromamplituden von  $<1 \text{ nA}$ . Die Kanalmutanten T329A und T101/S178/T329A wiesen eine deutlich höhere durchschnittliche Stromamplitude mit  $3,06 \pm 1,05 \text{ nA}$  und  $2,61 \pm 1,02 \text{ nA}$  auf. 58% bzw. 50% aller Zellen wiesen Stromamplituden von  $>1 \text{ nA}$  auf.

Der Zusatz von 1 mmol/l ATP zur Intrazellulärlösung induzierte bei allen Kanalmutanten einen Anstieg der Stromamplitude (T101A =  $5,97 \pm 1,61 \text{ nA}$ , S178A =  $3,41 \pm 0,71 \text{ nA}$ , T329A =  $4,13 \pm 0,89 \text{ nA}$ , T101/S178/T329A =  $4,20 \pm 1,01 \text{ nA}$ ) und erhöhte den Anteil aktiver Zellen mit einer Stromamplitude von  $>1 \text{ nA}$  deutlich (T101A = 67%, S178A = 80%, T329A = 72%, T101/S178/T329A = 72%).

Der Zusatz von ATP $\gamma$ S zur Intrazellulärlösung resultierte bei allen Mutanten in einem weiteren signifikanten Anstieg der Kanalaktivität (T101A =  $7,17 \pm 2,32$  nA, S178A =  $4,95 \pm 1,24$  nA, T329A =  $7,88 \pm 1,41$  nA, T101/S178/T329A =  $6,89 \pm 1,75$  nA). Bei allen untersuchten Zellen war die Stromamplitude >1 nA. Zellen



**Abb.19: Einfluß von ATP und ATP $\gamma$ S auf die Aktivität der cIK1-Kanalmutanten**

Vergleich der Stromantworten auf einen depolarisierenden Spannungspuls bei einer freien intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$  von  $0,1 \mu\text{mol/l}$ . Zusatz von ATP bzw. ATP $\gamma$ S zur Intrazellulärlösung induziert einen signifikanten Anstieg der Stromamplituden

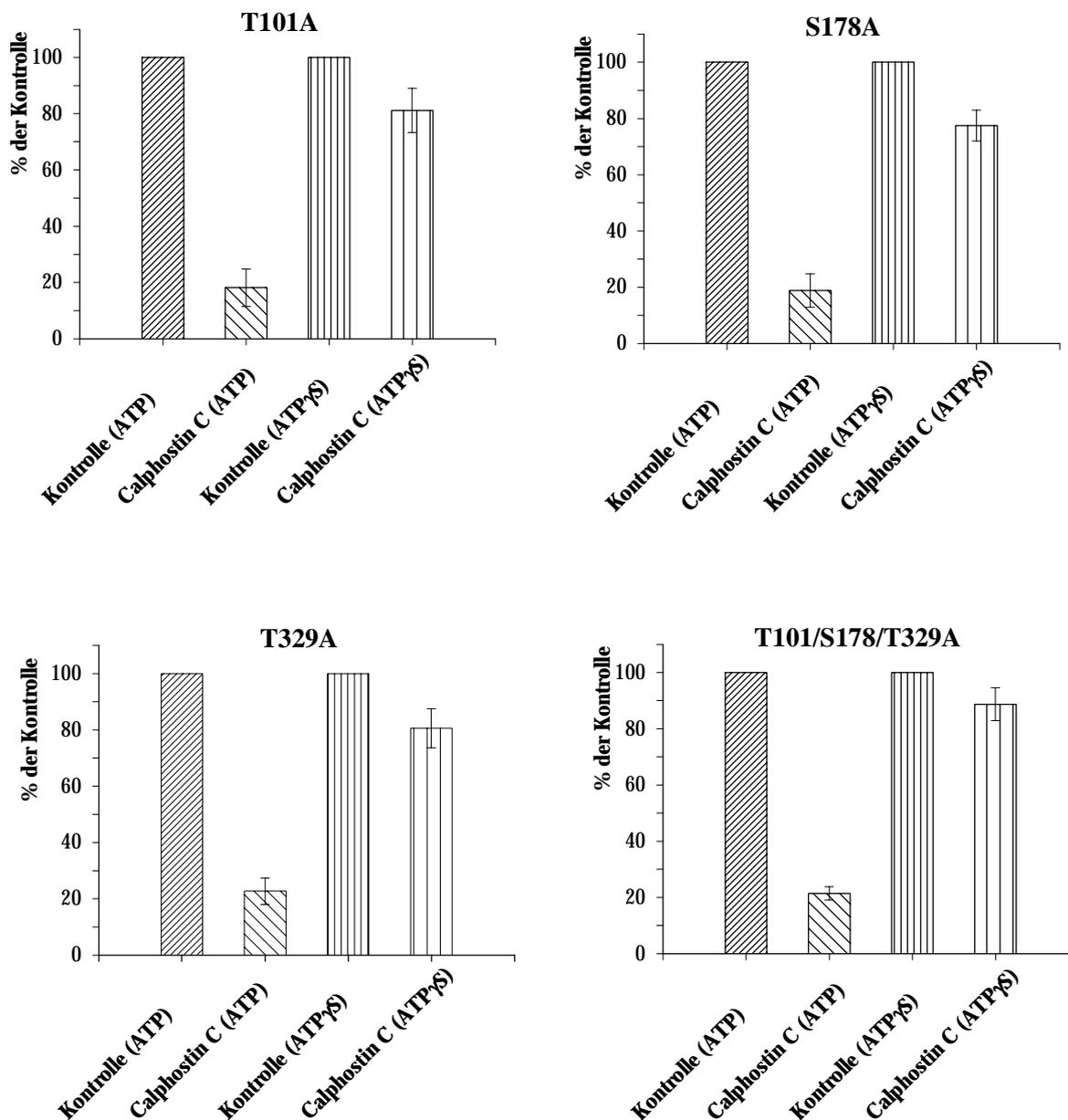
---

Die Versuche zeigen, daß trotz einer Mutation innerhalb der putativen Konsensussequenz für eine PKC-Phosphorylierung eine ATP-abhängige Regulierung der Kanalaktivität besteht. Der Austausch des Threonins durch Alanin an der Stelle T329 bewirkt bereits in ATP-freier Intrazellulärlösung eine Erhöhung der Stromamplitude und maskiert dadurch die stimulierende Wirkung von ATP.

### 3.5.3 Hemmbarkeit ATP-induzierten Stroms

Bei den Kanalmutanten konnte in Gegenwart von ATP $\gamma$ S eine signifikante Erhöhung der Kanalaktivität beobachtet werden. Um zu überprüfen, ob diese Aktivierung auf eine PKC-Phosphorylierungsreaktion zurückzuführen ist, wurde die PKC durch den selektiven PKC-Inhibitor Calphostin C blockiert so und die Hemmbarkeit ATP-induzierter Kanalaktivität überprüft.

Die Versuche wurden mit einer freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 0,1  $\mu$ mol/l und 1 mmol/l ATP bzw. 2 mmol/l ATP $\gamma$ S in der Pipettenlösung durchgeführt. Die Zellen wurden, nachdem sich ein Gleichgewichtsstrom eingestellt hatte, mit 0,1  $\mu$ mol/l Calphostin C superfundiert. Es wurden nur Zellen ausgewertet, die nach Äquilibration mit der Pipettenlösung Stromamplituden >1 nA aufwiesen. In Abbildung 19 sind die verbleibenden Stromantworten der die Kanalmutanten exprimierenden Zellen nach Applikation des PKC-Hemmstoffes als Prozent der Kontrolle dargestellt. Calphostin C führt zu einer signifikanten Hemmung der Stromamplitude (T101A = 18%; S178A = 19%; T329A = 23% bzw. T101/S178/T329A = 24%) der mit ATP induzierten Kanalaktivität der vier Mutanten. Zusatz von 2 mmol/l ATP $\gamma$ S zur Intrazellulärlösung verringert die inhibierende Wirkung des PKC-Hemmstoffes deutlich (T101= 81%; S178= 77%; T329A = 80%; T101/S178/T329A = 88%).



**Abb.20: Hemmbarkeit des ATP- induzierten cIK1-Stromes durch einen PKC-Inhibitor**

In Gegenwart von 1 mmol/l ATP wird die Kanalaktivität durch den PKC-Inhibitor Calphostin C trotz einer Mutation der putativen Phosphorylierungsstelle gehemmt. 2 mmol/l ATP $\gamma$ S in der Pipettenlösung verhindert die Hemmung der cIK1-Kanäle durch Calphostin C

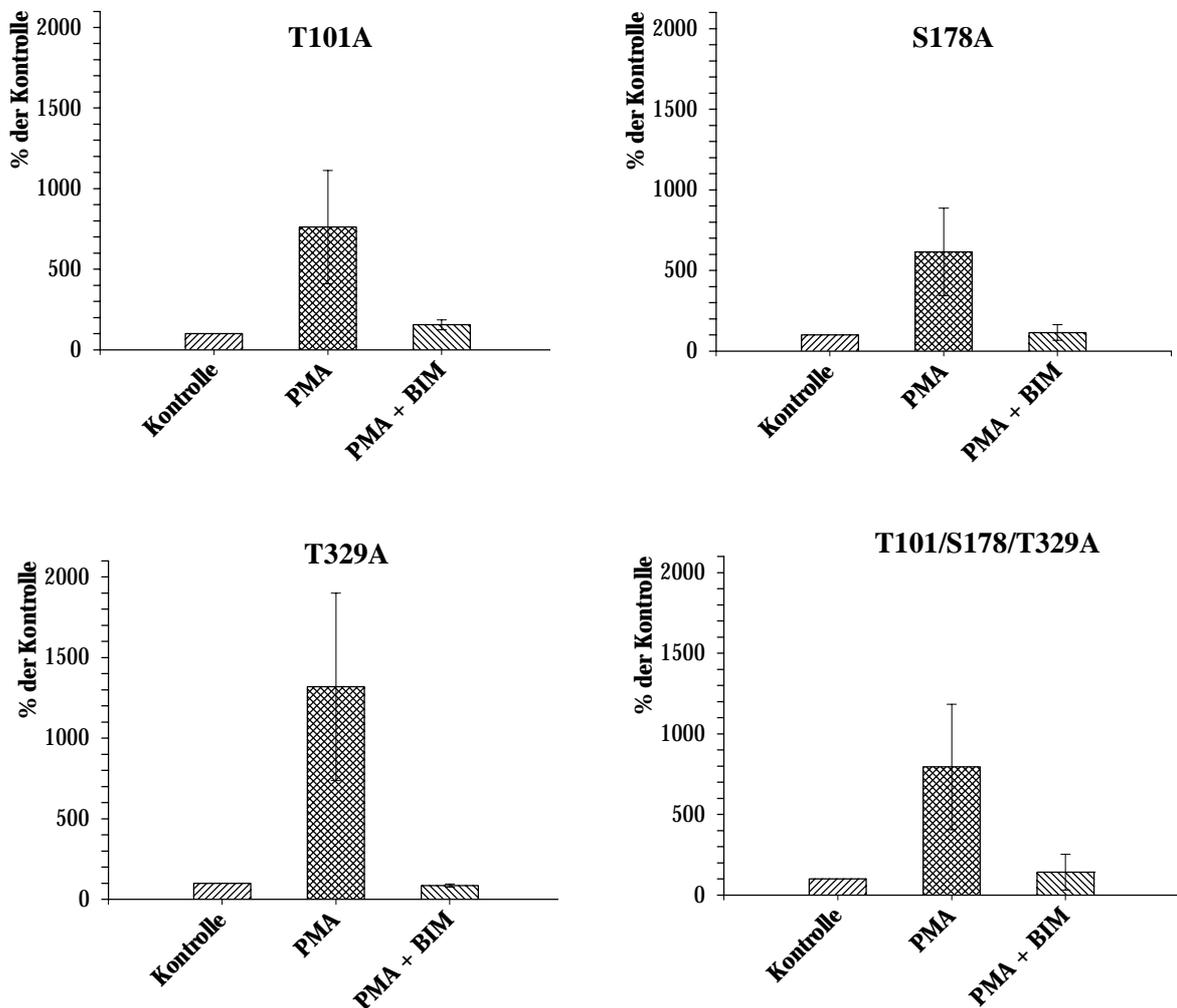
---

Die ATP-induzierte Kanalaktivität der Mutanten konnte mit der gleichen Effektivität wie der Wildtyp cIK1 durch den selektiven PKC-Hemmstoff Calphostin C inhibiert werden. Die durch ATP $\gamma$ S-induzierten Ströme der Kanalmutanten ließen ebenso wie die des Wildtyp-Kanals signifikant weniger hemmen. Hinsichtlich der Effektivität des Calphostin C zeigen sich keine Unterschiede zum Wildtyp-Kanal. Die Ergebnisse zeigen, daß nach wie vor eine ATP-abhängige Regulierung des Kanals durch die Proteinkinase C stattfindet, obwohl eine direkte Phosphorylierung des Proteins nicht möglich ist.

### **3.5.4 Aktivierung der PKC**

Eine akute Stimulierung der PKC resultierte beim Wildtyp cIK in einer extremen Steigerung der Kanalaktivität, die auf eine Phosphorylierung zurückzuführen ist. Trotz der Mutation der Konsensusmotive für die PKC-Phosphorylierung konnte eine ATP-abhängige Modulation der Kanalaktivität beobachtet werden, die sich durch selektive PKC-Hemmstoffe inhibieren ließ. Um zu überprüfen, ob auch eine direkte Aktivierung der PKC die Aktivität der mutierten Kanäle stimuliert, wurden den Zellen mit dem Phorbolster PMA superfundiert. Die Versuche wurden wie in 3.4.3 beschrieben mit einer freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 0,1  $\mu$ mol/l und 1 mmol/ATP in der Pipettenlösung durchgeführt.

In Abbildung 21 sind die Stromamplituden der mit 0,1  $\mu$ mol/l PMA aktivierten Zellen als Prozent der Kontrolle dargestellt. Eine akute Stimulierung inaktiver Zellen mit PMA führt in allen vier Fällen zu einem signifikanten Anstieg der Kanalaktivität. (T101A = 7,6-fach, S178A = 6,2-fach, T329A = 13,2-fach, . T101/S178/T329A = 8,0-fach). Die durch PMA induzierte Kanalaktivität ließ sich durch 0,1  $\mu$ mol/l Bisindolylmaleimid (BIM) vollständig hemmen.



**Abb.21: Akute Aktivierung der PKC mit Phorbol 12-Myristat 13-acetat (PMA)**

Kurzzeitige Stimulierung der PKC mit PMA führt zu einem signifikanten Anstieg der Kanalaktivität, der sich durch BIM blockieren läßt. Mutationen der putativen Phosphorylierungsstellen beeinflussen die Regulierung durch die PKC nicht.

Die Mutanten werden durch eine PKC-abhängige Regulierung genauso stark wie der Wildtyp-cIK1 aktiviert. Das Fehlen der Phosphorylierungsstellen beeinflusst die Aktivierung der Kanäle durch eine akute Stimulierung der PKC also nicht.

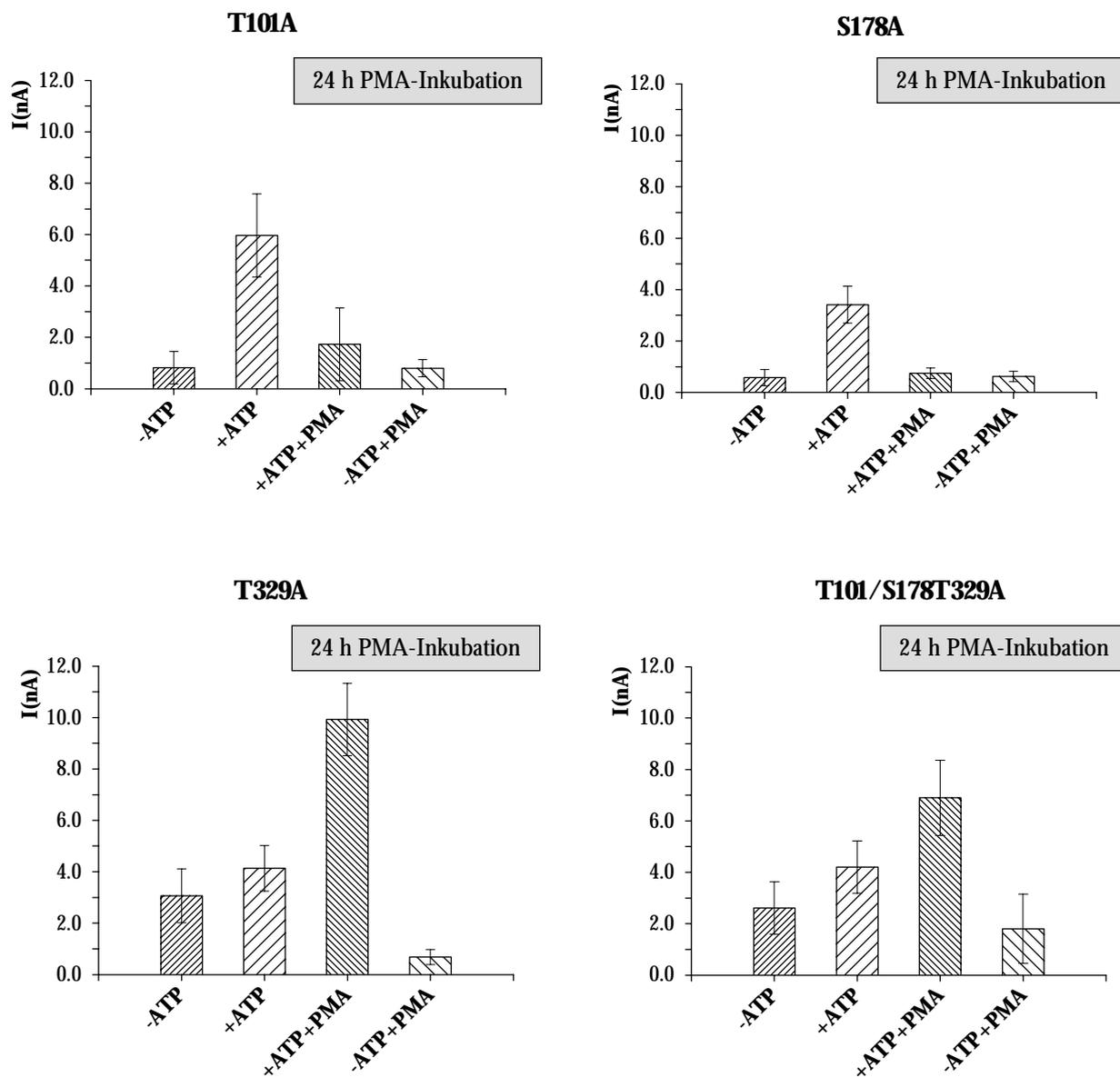
### 3.5.5 Langzeitstimulierung mit Phorbolestern

Um zu überprüfen, ob eine langfristige Inhibierung der PKC die phosphorylierungsbedingte Aktivierung der Kanalmutanten hemmt, wurden die Zellen 24 Stunden mit PMA inkubiert (3.4.4, s.S. 59). Die Versuche wurden mit 0,1  $\mu\text{mol/l}$  freiem  $\text{Ca}^{2+}$  in der Pipettenlösung durchgeführt. Die Ringerlösung, mit der die Zellen während der Experimente perfundiert wurden enthielt 0,1  $\mu\text{mol/l}$  PMA.

Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit PMA reagierten weniger als 20% der Zellen, die die Mutanten T101A und T178A exprimierten, mit einer Stromantwort ( $>1$  nA) auf den Testpuls. Auch der Zusatz von 1 mmol/l ATP zur Pipettenlösung konnte bei diesen cIK1-Mutanten keine Stromantwort induzieren (Abb. 22). Wie beim Wildtyp-cIK1 hemmt die Inhibierung der PKC auch bei den cIK1-Mutanten T101A und T178A die ATP-abhängige Regulierung der Kanalaktivität.

Bei den Zellen, die die cIK1-Mutanten T329A und die Dreifachmutante T101/S178/T329A exprimierten, resultierte die Inaktivierung der PKC bei Messungen mit ATP-freier Pipettenlösung in einer Inhibierung der Kanalaktivität. Die durchschnittliche Stromamplitude betrug  $0,68 \pm 0,29$  nA (T329A) und  $1,48 \pm 1,01$  nA (T101/S178/T329A). Weniger als 20% der Zellen, die die Mutante T329A bzw. die Dreifachmutante T101/S178/T329A exprimierten, reagierten nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit PMA mit einer Stromantwort ( $>1$  nA). Der Zusatz von 1 mmol/l ATP zur Pipettenlösung führte hingegen trotz der Inhibierung der PKC zu einem extremen Anstieg der Kanalaktivität bei den Mutanten T329A und T101/S178/T329A. 100% der Zellen beantworteten einen depolarisierenden Testpuls mit Strömen. Die mittlere Stromamplitude betrug  $9,92 \pm 1,41$  nA bzw.  $6,90 \pm 1,46$  nA. Die ATP-abhängige Regulierung der Kanalaktivität der Mutanten wird im Gegensatz zu der des Wildtyp-cIK1 durch die Inhibierung der PKC nicht gehemmt.

Die ATP-induzierte Kanalaktivität der cIK1-Mutanten T329A und T101/S178/T329A war während der Kontrolluntersuchungen bei ungehemmter der PKC-Aktivität signifikant geringer. In ATP-freier Lösung hingegen zeigten die Kanalmutanten bei Kontrollexperimenten eine deutlich höhere Kanalaktivität



**Abb.22: Inhibierung der PKC durch 24 h Inkubation der Zellen mit PMA**

Die Inhibierung der PKC hemmt die ATP-Empfindlichkeit der Kanalmutanten T101A und S178A. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit PMA erfolgt wie beim Wildtyp-cIK1 keine durch ATP induzierte Erhöhung der Kanalaktivität.

Durch die Inhibierung der PKC wird die ATP-Empfindlichkeit der cIK1-Mutante T329A und der Dreifachmutante T101/S178/T329A verstärkt. Die ATP-induzierte Erhöhung der Kanalaktivität ist nicht auf eine PKC-Phosphorylierung zurückzuführen.

---

Die Daten zeigen, daß eine langfristige Inhibierung der PKC die ATP-Empfindlichkeit der cIK1-Kanalmutanten T101A und S178A reduziert. Das Fehlen der Phosphorylierungsstellen T101 und S178 beeinflußt die Regulierung dieser Kanäle durch die PKC nicht. Damit verhalten sich diese Kanalmutanten genauso wie des Wildtyp-cIK1. Eine Mutation der Phosphorylierungsstellen T329 oder aller drei Phosphorylierungsstellen (T101, S178 und T329) des cIK1 demaskiert einen ATP-abhängigen Mechanismus der Kanalaktivierung. Aufgrund der Inhibierung der PKC nach 24-stündiger PMA-Inkubation kann der in Gegenwart von ATP beobachtete Anstieg der Kanalaktivität nicht auf eine PKC-Phosphorylierung zurückgeführt werden. Die phosphorylierungsabhängige Aktivierung der Kanäle durch eine akute Stimulierung der PKC wird durch diese Mutation nicht beeinflußt.

## 4. Diskussion

Ca<sup>2+</sup>-empfindliche K<sup>+</sup>-Kanäle mittlerer Leitfähigkeit (IK1-Kanäle) übernehmen wichtige Funktionen bei vielen physiologischen Prozessen wie z.B. bei der Zellproliferation, der epithelialen Salz- und Wassersekretion und der Zellmigration (Vandorpe et al., 1998; Ghanshani et al., 2000; Schwab, 2000 ). Pathophysiologisch spielen sie eine wichtige Rolle bei der Mukoviszidose, der Sichelzellanämie und bei bestimmten Formen der sekretorischen Diarrhoe (Devor et al, 1993; 1996; Brugnara et al, 1995). Daher sind diese Kanäle potentielle therapeutische Ziele zur Behandlung dieser Krankheiten. Für die Entwicklung spezifischer Aktivatoren und Inhibitoren dieser Kanäle ist es notwendig, ihre funktionellen und strukturellen Eigenschaften sowie die Mechanismen ihrer Regulierung zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des aus transformierten Nierenepithelzellen (MDCK-F-Zellen) klonierten Ca<sup>2+</sup>-sensitiven K<sup>+</sup>-Kanals mittlerer Leitfähigkeit (cIK1) und die Untersuchung seiner Regulierung durch die Proteinkinase C (PKC). Aufgrund der strukturellen Homologie des cIK1 zu anderen IK1-Kanalisformen lassen sich die Ergebnisse zur funktionellen Regulierung dieses Kanals auf die anderen Mitglieder der IK1-Familie übertragen.

#### 4.1 Vergleich des klonierten cIK1 mit IK1-Kanälen anderer Spezies

Die elektrophysiologischen Eigenschaften des cIK1 stimmen weitgehend mit denen anderer IK1-Kanalisoformen überein. Obwohl die Sequenzhomologie (85% - 91%) zu den anderen IK1-Kanälen geringer ist als der Grad der Identität zwischen Mitgliedern anderer Subfamilien von K<sup>+</sup>-Kanälen (Kv1.3 >96,0% Kv1.4 >96,4%; Kv 4,3 >99,4%), sind nur geringe Unterschiede hinsichtlich der K<sup>+</sup>-Selektivität und Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität zu verzeichnen (vgl. Tabelle 1, s.S. 51). Auch das pharmakologische Profil des klonierten cIK1 entspricht weitgehend dem der anderen beschriebenen IK1-Kanäle. Der Kanal wird durch Barium, Charybdotoxin und Clotrimazol blockiert und zeigt damit die typischen pharmakologischen Eigenschaften von IK1-Kanälen (Dunn, 1999; Rauer et al., 2000). Eine Stimulierung durch 1-EBIO, einen spezifischen Aktivator von IK1-Kanälen (Devor et al., 1996; 1997), bewirkt konzentrationsabhängig eine extreme Erhöhung der Kanalaktivität. 1-EBIO erhöht die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle wahrscheinlich durch eine direkte Interaktion mit dem Kanalprotein (Pedersen et al., 1999). Aus diesem Grund eignete sich 1-EBIO bei den Untersuchungen zur Regulierung des cIK1 gut als Kontrollsubstanz, um die cIK1-Expression bei Zellen zu überprüfen, die keine Kanalaktivität aufwiesen und bei denen eine applizierte Testsubstanz keine aktivierende Wirkung hatte. Es wurde beschrieben, daß die Wirkung von 1-EBIO auf den hIK1 unabhängig von ATP-abhängiger Phosphorylierung ist und die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität der Kanäle nicht verändert (Cuthbert et al., 1999; Syme et al., 2000). Für den cIK scheint dieser Sachverhalt nicht zuzutreffen. Die 1-EBIO-Wirkung erfolgte bei ATP-haltiger Pipettenlösung bereits bei wesentlich geringeren Konzentrationen als mit ATP-freier Lösung. Der Phosphorylierungszustand scheint demnach beim cIK1 die Wirkung von 1-EBIO zu modulieren.

Da die Wirkkonstanten der getesteten pharmakologischen Substanzen und die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität des cIK1 in dem für IK1-Kanäle beschriebenen Bereich liegen, ist es sicher, daß der cIK1 ein Mitglied dieser Kanalfamilie ist. Damit ist es möglich, die Untersuchungen zur Regulierung dieser Kanäle zu übertragen. Allerdings variieren die Literaturdaten insbesondere zur Phosphorylierung der verschiedenen IK1-Isoformen deutlich. Möglicherweise sind diese Unterschiede jedoch durch die jeweiligen

---

Versuchsbedingungen, das Expressionssystem oder auch Unterschiede innerhalb der Aminosäuresequenz erklären:

Zur Charakterisierung wurde der cIK1 heterolog in HEK293- und CHO-Zellen exprimiert. In diesen Zellen werden nur in geringem Maße endogene K<sup>+</sup>-Kanäle exprimiert (Yu und Kerchner, 1998), die die biophysikalischen Eigenschaften modulieren könnten. Es ist jedoch denkbar, daß das jeweils genutzte Expressionssystem die funktionellen Eigenschaften heterolog exprimierter Kanäle beeinflusst und diese sich daher funktionell von denen nativer Isoformen unterscheiden können. Es konnte gezeigt werden, daß in Oocyten die Überexpression transfizierter Kanäle eine atypische Expression endogener Ionenkanäle bewirkt, deren Aktivität die der untersuchten Kanäle verdeckt (Tzounopoulos et al., 1995; 1998). Da die Expression von Enzymen in Abhängigkeit vom Zelltyp stark variiert (Martel, et al., 1997), ist es möglich, daß die Funktion nativer IK1-Kanäle durch eine Interaktion mit endogenen Regulatorproteinen im Gegensatz zu klonierten Kanälen unterschiedlich beeinflusst wird (Sanguinetti et al., 1997; 1999).

Trotz der strukturellen Homologie der IK1-Kanäle, unterscheiden sich die Kanalisofomen vor allem im Bereich der Aminosäuresequenz des C-Terminus deutlich voneinander. Die Aminosäuresequenz der IK1-Kanäle weist z.B. eine konservierte PKA-Phosphorylierungsstelle auf, die dem cIK1 fehlt. Diese befindet sich im proximalen Bereich des C-Terminus, der über die Bindung von Calmodolin die Ca<sup>2+</sup>-Empfindlichkeit der IK1-Kanäle vermittelt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität dieser Kanäle im Gegensatz zum cIK1 durch eine direkte PKA-abhängige Phosphorylierung reguliert wird. Möglicherweise lassen sich diese Regulierungsunterschiede als typische Charakteristika einer eigenständigen Familie erklären. (Latorre, 1989). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß einige Mitglieder der IK1-Kanalfamilie, ähnlich wie die SK-Kanäle (SK1, SK2 und SK3), eine eigene Subfamilie bilden.

## 4.2 Vergleich des klonierten cIK1 mit dem nativen cIK1 aus MDCK-Zellen

Der native cIK1 übernimmt wichtige Funktionen bei der Migration transformierter MDCK-F-Zellen. Eine wesentliche Voraussetzung für die Zellbewegung ist neben cytoskeletalen Umbauvorgängen die morphologische und funktionelle Polarisierung von Ionenkanälen und Transportern in migrierenden Zellen (Schwab, 2001). In MDCK-F-Zellen vermittelt dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindliche  $\text{K}^+$ -Kanal u.a. die für die Migration notwendige Volumenabnahme am hinteren Zellpol und erleichtert damit die Retraktion des Zellkörpers (Schwab et al., 1995; 1999; Schneider et al., 2000). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen des klonierten cIK1 aus MDCK-Zellen zeigen, daß die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften des klonierten cIK1 mit dem des nativen  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen  $\text{K}^+$ -Kanal aus MDCK-Zellen weitgehend übereinstimmen. Die Untersuchungen bestätigen, daß der klonierte und der native cIK1 identisch sind.

Im Gegensatz zum klonierten cIK1 reagierte der native Kanal jedoch extrem  $\text{Ca}^{2+}$ -insensitiv. In fusionierten MDCK-Zellen lag seine halbmaximale Aktivierung bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von  $>100 \mu\text{mol/l}$  (Schwab et al., 1993). Diese unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität deutet darauf hin, daß die funktionelle Expression oder die Regulierung des nativen cIK1 in MDCK-Zellen noch weiteren Mechanismen unterliegt, die im heterologen Expressionssystem fehlen. Möglicherweise wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit dadurch reguliert, daß der native cIK1 in MDCK-Zellen mit zellspezifisch exprimierten  $\beta$ -Untereinheiten interagiert oder Heteromultimere mit kompatiblen  $\alpha$ -Untereinheiten endogen exprimierter  $\text{K}^+$ -Kanäle bildet. Eine Zusammenlagerung verschiedener Untereinheiten, wie es für Kv-Kanäle beschrieben wurde, könnte die funktionellen Eigenschaften des Kanals verändern (Snyders, 1999; Biggin et al., 2000). Es wäre ebenfalls denkbar, daß bedingt durch alternatives Spleißen des Kanalproteins die Regulierung des nativen Kanals im Vergleich zum heterolog exprimierten cIK1 verändert ist. Untersuchungen an IK1-Kanälen haben gezeigt, daß in verschiedenen Zellen Transkripte unterschiedlicher Größe dieses Kanals vorliegen (Logsdon et al., 1997; Ishii et al., 1997). Die Funktion des cIK1 in MDCK-F-Zellen für die Migration setzt die Aktivität dieses Kanals am hinteren Zellpol voraus. Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, daß das

---

cIK1-Kanalprotein am Lamellipodium (vorderer Zellpol) und nicht am hinteren Zellpol angereichert ist (Schwab et al., 2001). Der Kanal scheint jedoch am Lamellipodium inaktiv zu sein (Schwab et al., 1995; 2001). Eine unterschiedliche Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierten IK1-Kanäle an den beiden Zellpolen setzt voraus, daß innerhalb der Zelle ein Gradient der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration besteht oder die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität durch andere Steuerungsmechanismen graduell moduliert wird. Zwar konnte gezeigt werden, daß in MDCK-F-Zellen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient innerhalb der Zelle besteht (Schwab et al., 1997), jedoch läßt sich die graduelle Abstufung der Aktivierung des cIK1 nur ungenügend durch einen lokalen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erklären. Die relativ hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität des klonierten cIK1 ( $\text{IC}_{50} = 0,15 \mu\text{mol/l}$ ) läßt vermuten, daß dieser Kanal aufgrund der oszillierenden intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in MDCK-F-Zellen (Schwab et al., 1994) auch am Lamellipodium zumindest phasenweise geöffnet ist.

Daher ist es vorstellbar, daß zusätzlich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des cIK1 moduliert wird. Es konnte gezeigt werden, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit des nativen cIK1 maßgeblich unter dem Einfluß der PKC steht (Schwab et al., 1993). Die unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität oder Regulierung der Kanäle am vorderen und hinteren Zellpol ließe sich durch einen intrazellulären PKC-Gradienten erklären, wie er in T-Lymphocyten nachgewiesen wurde (Entschladen et al., 1997). Eine phosphorylierungsabhängige Regulierung würde auch die im Vergleich zum klonierten cIK1 deutlich geringere  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit des nativen Kanals erklären, da die Kinase- und Phosphataseaktivität von Zellen oder deren Ausstattung mit intrazellulären Botenstoffen und Regulatorproteinen in Abhängigkeit vom Gewebe oder der Spezies extrem variiert (Martel et al., 1997).

#### **4.3 Regulierung der IK1-Kanäle durch die Proteinkinase A**

Die Regulierung von IK1-Kanälen durch eine PKA-abhängige Phosphorylierung wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, daß die Aktivität von hIK1-Kanälen durch eine PKA-abhängige Phosphorylierung stimuliert wird. Diese Annahme stützt sich insbesondere auf die Beobachtung, daß sich die durch ATP induzierte Kanalaktivität mit dem spezifischen PKA-Hemmstoff  $\text{PKI}_{5-24}$

---

hemmen ließ (Pellegrino und Pellegrini, 1998; Kamatsu et al., 1996). Diesen Ergebnissen widersprechen einige Untersuchungen an heterolog exprimierten IK1-Kanalisoformen, bei denen sich die ATP-induzierte Kanalaktivität nicht durch Phosphatasen oder PKA-Inhibitoren hemmen ließ (Gerlach et al., 2001) und eine Stimulierung der PKA die Kanalaktivität nicht veränderte (Gerlach et al., 2000). Obwohl innerhalb der Aminosäuresequenz aller IK1-Kanäle (mit Ausnahme des cIK1) eine Konsensussequenz für eine PKA-abhängige Phosphorylierung konserviert ist, kann eine direkte Phosphorylierung des Kanalproteins durch die PKA inzwischen jedoch ausgeschlossen werden: Der Austausch eines Serins zu Alanin an der PKA-Phosphorylierungsstelle beeinflusst die Sensitivität gegenüber dem PKA-Hemmstoff PKI<sub>5-25</sub> nicht (Schrøder et al., 2000). Diese widersprüchlichen Daten werden zum einen auf das jeweilige Zellsystem zurückgeführt, in dem die Kanäle untersucht wurden (Martel et al., 1998), zum anderen wird eine direkte Interaktion des Kanalproteins mit dem in diesen Untersuchungen verwendeten Phosphodiesterase-Hemmstoff Theophyllin diskutiert (Schrøder et al., 2000; Gerlach et al., 2001).

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten zeigen, daß eine Stimulierung der PKA mit cAMP und Theophyllin die Kanalaktivität des heterolog exprimierten cIK1 nicht beeinflusst. Damit verhält sich der klonierte Kanal wie der native cIK1 in MDCK-Zellen (Schwab et al., 1993). Im Gegensatz dazu konnte der hIK1 sowohl in CHO- als auch in HEK293-Zellen durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels bei gleichzeitiger Hemmung der Phosphodiesterase aktiviert werden. Diese Daten deuten darauf hin, daß Unterschiede innerhalb der Aminosäuresequenz beider Kanalisoformen diese verschiedenartige Regulierung verursachen. Die Aminosäuresequenz des cIK1 enthält im Gegensatz zu allen anderen klonierten IK1-Isoformen keine Konsensussequenz für eine PKA-abhängige Phosphorylierung, so daß eine PKA-abhängige Phosphorylierung des Kanalproteins nicht möglich ist. Der Einfluß des Expressionssystems konnte bei diesen Experimenten ausgeschlossen werden, da sowohl die Aktivierung des hIK1 durch cAMP und Theophyllin als auch die ausbleibende Wirkung dieser Substanzen beim cIK1 unter den gleichen Bedingungen beobachtet wurde. Allerdings geben die durchgeführten Experimente keinen Aufschluß darüber, ob der beobachtete Anstieg der Kanalaktivität tatsächlich auf eine PKA-abhängige Phosphorylierung zurückzuführen ist, oder ob der

hIK1 durch eine Interaktion mit Theophyllin aktiviert wurde. Auch in diesem Fall wären Unterschiede innerhalb der Aminosäuresequenz des Kanalproteins für die unterschiedliche Sensitivität gegenüber Theophyllin verantwortlich. Die PKA-Konsensussequenz des hIK1 liegt im Bereich des proximalen C-Terminus direkt neben einer PKC-Phosphorylierungsstelle. Eventuell moduliert eine zeitgleiche Phosphorylierung mehrerer Aminosäurereste oder deren Interaktion die Kanalaktivität. Diese Möglichkeit bietet eine Erklärung dafür, daß die in dieser Arbeit durchgeführte Stimulierung der PKC auf die Kanalaktivität des hIK1 im Vergleich zum cIK1 einen deutlich geringeren Effekt hatte.

#### **4.4 Regulierung der IK1-Kanäle durch die Proteinkinase C**

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß die Kanalaktivität des klonierten cIK1 durch eine ATP-abhängige Regulierung stimuliert wird. Da ATP als Phosphatdonator verschiedener enzymatischer Reaktionen dient, lag die Vermutung nahe, daß eine phosphorylierungsabhängige Regulierung stattfindet. Insbesondere der signifikante Anstieg der Kanalaktivität in Gegenwart des phosphatasebeständigen ATP $\gamma$ S unterstützte diese Hypothese. Sowohl die Aktivierung der Kanäle nach einer akuten Stimulierung der PKC als auch deren vollständige Inhibierung nach einem Abbau der PKC-Moleküle spricht für einen Mechanismus der Kanalregulierung, in dem die PKC eine wesentliche Rolle spielt. Auch die Hemmung der Ströme durch spezifische PKC-Inhibitoren zeigt, daß die ATP-induzierte Kanalaktivität auf eine PKC-abhängige Phosphorylierung zurückzuführen ist. Eine direkte Blockierung der Kanalpore durch die PKC-Hemmstoffe, wie sie beim Kv1.5 nach Applikation von BIM beobachtet wurde (Choi et al., 2000), kann beim cIK1 ausgeschlossen werden, da mit BIM und Calphostin C zwei strukturell nicht miteinander verwandte Substanzen verwendet wurden, die die PKC an unterschiedlichen Stellen inhibieren. Die Hemmung der Kanäle ist daher auf die Aktivität endogener Phosphatasen zurückzuführen. Die schnelle Wirkung der verwendeten Inhibitoren deutet auf eine relativ hohe Phosphataseaktivität in den Zellen hin. Die im Gegensatz dazu nur teilweise eingetretene Hemmung der ATP $\gamma$ S-induzierten Kanalaktivität durch die PKC-

---

Inhibitoren ist darauf zurückzuführen, daß die mit ATP $\gamma$ S erfolgte Phosphorylierung praktisch irreversibel ist und daher eine Dephosphorylierung durch endogene Phosphatasen fast unmöglich ist. Diese Beobachtung bestätigt die Hypothese, daß eine PKC- Phosphorylierung die Aktivität der cIK1-Kanäle moduliert

Die PKC-abhängige Erhöhung der Stromamplitude in den Zellen kann einerseits auf eine veränderte Regulierung der Kanalaktivität des cIK1 zurückgeführt werden. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß die Anzahl funktioneller Kanäle in der Membran erhöht wird. Die Wirkung der PKC kann sowohl durch eine direkte Phosphorylierung des Kanalproteins als auch indirekt durch Phosphorylierung intrazellulärer Regulatorproteine erfolgen.

Es besteht die Möglichkeit, daß eine Phosphorylierung die Anzahl der Kanalproteine in der Zellmembran beeinflußt. Die PKC-abhängige Phosphorylierung von Proteinen in der Nähe von Endozytose-Signalsequenzen (Di-Leucin-Motiv) führt zur Internalisierung dieser Proteine (Dietrich et al., 1994). Solche Endozytose-Signalsequenzen befinden sich im C-Terminus des cIK1 in der Nähe einer PKC-Phosphorylierungsstelle. Dieser Mechanismus begünstigt jedoch den Ausbau von Proteinen aus der Membran und kann daher nicht die Erhöhung der Kanalaktivität nach einer PKC Stimulierung erklären.

Es wäre weiterhin denkbar, daß die erhöhte Kanalaktivität auf eine erhöhte Expression zurückzuführen ist. Es konnte gezeigt werden, daß eine PKC-Stimulierung in T-Lymphocyten die Transkription bzw. Translation von IK1-Kanälen verstärkt (Ghanshani et al., 2000). Die PKC erhöht wahrscheinlich die Aktivität der für die Proliferation dieser Zellen notwendigen MAP-Kinase (Okazaki et al., 2000) oder einen Signalweg in den RAS/MEK/ERK-Kinase involviert ist (Pena et al., 2000). Die Erhöhung der Kanalaktivität in diesen Experimenten erfolgte jedoch nach frühestens dreistündiger Inkubation der Zellen mit PMA und kann daher nicht die sofortige Erhöhung der Kanalaktivität des cIK1 nach einer PKC-Stimulierung in den hier durchgeführten Experimenten erklären.

Möglicherweise könnte eine direkte Phosphorylierung des Kanals die spontane Erhöhung der Stromamplitude des cIK1 erklären. Eine Phosphorylierung des Kanalproteins könnte die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität erhöhen. Bei KATP Kanälen und bei BK-Kanälen wurde gezeigt, daß deren ATP- bzw. Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität durch eine direkte Phosphorylierung des

---

Kanalproteins verändert wird (McHugh et al., 2000; Light et al., 2000). Wie bei den hier durchgeführten Versuchen erfolgte diese Aktivierung innerhalb weniger Minuten. Es wäre ebenfalls denkbar, daß die PKC die Interaktion mit intrazellulären  $\beta$ -Untereinheiten vermittelt und eine so Konformationsänderung des Kanalproteins bewirkt, die den Offenzustand der Pore stabilisiert.

Da bei der akuten Stimulierung der PKC zwei verschiedene Reaktionscharakteristiken unterschieden wurden, deutet dies eventuell auf einen weitaus komplizierteren Mechanismus der Kanalregulierung hin, in dem sich aktivierende und inhibierende Regulierungsmechanismen im Gleichgewicht befinden

#### **4.5 Einfluß der Mutationen auf die Kanalaktivität**

Die Untersuchung hat gezeigt, daß Mutationen der putativen PKC-Phosphorylierungsstellen die biophysikalischen Eigenschaften des cIK1 nicht verändern. Die Kanalmutanten bilden funktionelle Kanäle mit den typischen Eigenschaften des Wildtyp cIK1. Die Daten belegen, daß Punktmutationen in diesen Bereichen des Kanalproteins weder die Transkription der Proteine noch die Interaktion der vier Kanaluntereinheiten, die für die Ausbildung eines funktionellen Tetramers erforderlich ist beeinflussen (Xu et al., 1995; MacKinnon, 1991). Die Regulierung der Kanalaktivität durch eine PKC-abhängige Phosphorylierung erfolgt trotz einer Mutation an den drei putativen Phosphorylierungsstellen T101, S178 und T329. Diese Daten widersprechen einer direkten Phosphorylierung des Kanalproteins an diesen Stellen und sprechen eher für eine indirekte Regulierung durch die PKC (s.S. 80).

Die Mutationen der Phosphorylierungsstelle T329 oder aller drei Phosphorylierungsstellen T101/S178/T329 demaskieren einen zweiten Weg der Kanalregulierung, der unabhängig von einer PKC-abhängigen Phosphorylierung ist. Dieser zweite Mechanismus der Regulierung, der erst durch die Mutationen und nach einem vollständigen Abbau der PKC-Moleküle sichtbar wurde, ist ATP-abhängig und hat eine inhibierende Wirkung. Bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von 30 nmol/l bzw 100 nmol/l fielen diese cIK1-Mutanten aufgrund ihrer hohen Kanalaktivität auf (s.S. 61).

---

Die erhöhte Stromamplitude ist entweder auf eine höhere Zahl von Kanalproteinen in der Membran oder eine veränderte Regulierung der Kanäle zurückzuführen. Bei einer unveränderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit würde die erhöhte Stromamplitude auf eine höhere Expression hinweisen. Eine erhöhte Effizienz bei der Transfektion der Kanalmutanten T329A und T101/S178/T329A kann bei diesen Versuchen dagegen ausgeschlossen werden. Die Experimente wurden bei verschiedenen Passagen der Zellen und an unterschiedlichen Zellkulturen durchgeführt, die sich hinsichtlich der Aktivität der Kanäle nicht unterschieden. In der unmittelbaren Nähe der Phosphorylierungsstelle T329 befindet sich an der Stelle L344/345 ein Dileucin-Motiv. Diese Konsensussequenz reguliert den gerichteten Transport des cIK1 in die Membran (Schwab, 2001). Es konnte gezeigt werden, daß eine Phosphorylierung im Bereich von Dileucin-Motiven, die Endocytose und somit die Entfernung von Proteinen aus der Zellmembran begünstigt (Cousin et al., 2001, Krantz et al. 2000, Fingerhut et al. 2001). Wird die Phosphorylierung im Bereich des Dileucinmotivs verhindert, verbleibt mehr Protein in der Membran, was sich in einer erhöhten Stromamplitude äußert.

Unter der Voraussetzung, daß die Anzahl der Kanalproteine mit der Mutation T329 in der Membran unverändert ist, würde die erhöhte Kanalaktivität auf darauf hindeuten, daß dieser Bereich der Aminosäuresequenz die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des cIK1 moduliert. Die mutierte PKC-Phosphorylierungsstelle T329 befindet sich im proximalen Bereich des C-Terminus innerhalb der Calmodulin-bindenden Domäne, die die  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit des Kanal vermittelt (Fanger et al., 1999; Khanna et al., 1999). Für SK-Kanäle wurde kürzlich gezeigt, daß die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin die C-Termini zweier  $\alpha$ -Untereinheiten verbindet (Schumacher et al., 2001). Diese in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  stattfindende Konformationsänderung findet möglicherweise ebenfalls bei IK1-Kanälen statt. Es ist denkbar, daß eine Mutation innerhalb dieser Sequenz die Zusammenlagerung und damit die Regulierung stört. Möglicherweise ist die erhöhte Kanalaktivität auf die Kombination einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit und die verstärkte Expression von IK1-Kanälen zurückzuführen. Es wurde gezeigt, daß die Differenzierung von T-Lymphozyten, in denen IK1-Kanäle eine wichtige Rolle bei der Proliferation spielen, von der Balance eines  $\text{Ca}^{2+}$ - und eines PKC-abhängigen Signalweges abhängt (Noble et al., 2000; Ganshani, 2000).

---

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß die Aktivität des cIK1 durch zwei voneinander unabhängige Mechanismen reguliert wird. Eine PKC-abhängige Phosphorylierung erhöht die Aktivität der Kanäle, findet jedoch nicht an den bekannten PKC-Konsensussequenzen des Kanalproteins statt. Der zweite Mechanismus der Kanalregulierung benötigt ATP und hat einen inhibierenden Effekt. Diese Daten decken sich mit Untersuchungen von humanen IK1-Kanälen, die zeigten, daß ATP bei sehr hohen Konzentrationen (Nielsen et al., 1998; Shindo et al., 2000) oder in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  diese Kanäle blockiert (Komatsu et al., 1996). Die inhibierende Wirkung von ATP ist vor allem für die ATP-regulierten  $K^+$ -Kanäle bekannt, die bei geringen ATP-Konzentrationen durch eine Phosphorylierungsreaktion aktiviert werden (Ashcroft und Ashcroft, 1990, Findlay, 1994). Es auch für IK1-Kanäle möglich, daß das Gleichgewicht zweier ATP-abhängiger Signalwege die Aktivität dieser Kanäle reguliert. Damit ließe sich auch erklären, daß beim cIK1 die PKC-Aktivierung nicht bei jeder Zelle eine stimulierende Wirkung auf die Kanalaktivität hatte.

Obwohl die Aminosäuresequenz des cIK1 kein Konsensusmotiv für eine ATP-Bindung aufweist, besteht die Möglichkeit, daß erst eine  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Konformationsänderung des Kanalproteins eine ATP-Bindung ermöglicht. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß erst durch die Mutation dieser Sequenz eine veränderte Regulierung induziert wurde. Um den Mechanismus dieser Regulation aufzuklären, ist es notwendig weitere Untersuchungen durchzuführen.

## 5. Zusammenfassung

Ca<sup>2+</sup>-empfindliche K<sup>+</sup>-Kanäle mittlerer Leitfähigkeit (IK1-Kanäle) übernehmen wichtige Funktionen bei vielen physiologischen Prozessen wie z.B. bei der Zell-Proliferation, der epithelialen Salz- und Wasser-Sekretion und der Zellmigration. Die Kanäle werden durch die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration reguliert, wobei ihre Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität durch Phosphorylierungsreaktionen moduliert werden kann.

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des aus transformierten Nierenepithelzellen (MDCK-F-Zellen) klonierten Ca<sup>2+</sup>-sensitiven K<sup>+</sup>-Kanals mittlerer Leitfähigkeit (cIK1) und die Untersuchung seiner Regulierung durch die Proteinkinase C (PKC). Dazu wurde der Kanal heterolog in CHO- und HEK293-Zellen exprimiert. Seine biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften sowie der Einfluß der Proteinkinase C auf die Kanalaktivität wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik untersucht. Die cIK1-Ströme sind schwach einwärtsrektifizierend, zeigen keine Aktivierungs- oder Inaktivierungskinetik und weisen im physiologischen Bereich keine Spannungsabhängigkeit auf. Der cIK1 ist K<sup>+</sup>-selektiv und wird durch einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration aktiviert. Der Kanal wird durch Barium, Charybdotoxin und Clotrimazol blockiert und durch 1-Ethyl-2-Benzimidazolol aktiviert. Die funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften des klonierten cIK1 entsprechen damit denen des nativen Kanals aus MDCK-F-Zellen und stimmen mit denen anderer Mitglieder der IK1-Kanalfamilie überein.

Neben der Regulierung durch die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wird der cIK1 auch durch eine PKC-abhängige Phosphorylierung reguliert. Sowohl ATP als auch ATP $\gamma$ S

stimulieren die Kanalaktivität. Die ATP-abhängige Aktivierung wird durch Inhibitoren der Proteinkinase C (Bisindolylmaleimid, Calphostin C) gehemmt, während die mit ATP $\gamma$ S induzierte Kanalaktivität weitgehend resistent gegen diese PKC-Inhibitoren ist. Eine Stimulierung der Proteinkinase C mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) führt zu einer sofortigen Aktivierung des cIK1. Im Gegensatz dazu sind die cIK1-Kanäle nach fast vollständigem Abbau der Proteinkinase C durch eine langfristige Inkubierung der Zellen mit PMA nicht mehr aktiv.

Um zu untersuchen, ob diese Regulierung eine direkte Interaktion der Proteinkinase C mit dem Kanalprotein erfordert, wurden die drei putativen PKC-Konsensussequenzen des cIK1 mittels zielgerichteter Mutagenese so verändert, daß eine Phosphorylierung an diesen Stellen nicht mehr möglich ist. Weder die einzelne Mutation der PKC-Konsensussequenzen (T101, S178, T329) noch die gleichzeitige Mutation aller drei Phosphorylierungsstellen zu Alanin beeinflußt die akute Regulierung des cIK1 durch die Proteinkinase C. Die cIK1-Mutante T329A und die Dreifachmutante reagieren jedoch nach einem Abbau der Proteinkinase C mit einem extremen Anstieg der Kanalaktivität und demaskieren damit einen zweiten Weg der Kanalregulierung.

Die Ergebnisse zeigen, daß der cIK1 durch zwei voneinander unabhängige Mechanismen reguliert wird. Eine PKC-abhängige Phosphorylierung erhöht die Aktivität der Kanäle, findet jedoch nicht an den bekannten PKC-Konsensussequenzen des Kanalproteins statt. Dagegen werden die cIK1-Kanäle über einen zweiten ATP-abhängigen Mechanismus, der wahrscheinlich eine direkte Interaktion mit dem Kanalprotein erfordert, gehemmt.

## Summary

Ca<sup>2+</sup> sensitive K<sup>+</sup> channels of intermediate conductance (IK1 channels) are required for many physiological functions such as cell proliferation, epithelial transport or cell migration. The intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration is the most important regulator of IK1 channels. Their Ca<sup>2+</sup> sensitivity can be modified by phosphorylation-dependent reactions. The aim of this study was the functional characterisation of the canine isoform cIK1 cloned from transformed renal epithelial cells (MDCK-F cells) and the investigation of mechanisms by which it is regulated by protein kinase C (PKC). cIK1 channels were heterologously expressed in CHO and HEK293 cells and investigated by means of patch clamp technique. cIK1 channels elicit a K<sup>+</sup> selective, inwardly rectifying, and Ca<sup>2+</sup>-dependent current. It is inhibited by barium, charybdotoxin, clotrimazole, and activated by 1-ethyl-2-benzimidazolone. The electrophysiological and pharmacological characteristics thereby correspond to those of native cIK1 channels from MDCK-F cells and those of other IK1 channel isoforms.

CIK1 channel are regulated by the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and in addition by protein kinase C. They are activated by the intracellular application of ATP or ATP $\gamma$ S. ATP-dependent activation is reversed by protein kinase C inhibitors (bisindolylmaleimide, calphostin C), while stimulation with ATP $\gamma$ S resists protein kinase C inhibition. Stimulation of protein kinase C with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) leads to the acute activation of cIK1 currents. In contrast, PKC depletion by overnight incubation with PMA prevents ATP-dependent cIK1 activation.

To investigate whether this regulation requires a direct interaction with the channel protein, the three putative protein kinase C phosphorylation sites were mutated, so that the channel protein would no longer be phosphorylated at those residues. Neither single mutations nor the simultaneous mutation of all protein kinase C phosphorylation sites (T101, S178, T329) to alanine alter the acute regulation of cIK1 channels by protein kinase C. However, current amplitudes of the cIK1 mutant T329A and the triple mutant are dramatically increased upon longterm treatment with PMA. These mutations thereby disclose an inhibitory effect on cIK1 current of protein kinase C phosphorylation site at T329.

Our results indicate that cIK1 activity is regulated in two ways. Protein kinase C dependent activation of cIK1 channels occurs indirectly, while the inhibitory effect probably requires a direct interaction with the channel protein.

## 5. Literaturverzeichnis

- J. Aqvist und V. Luzhkov (2000): Ion permeation mechanism of the potassium channel. *Nature* **404**: 881-884.
- S. J. Ashcroft und F. M. Ashcroft (1990): Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal.* **2**: 197-214.
- P. C. Biggin, T. Roosild und S. Choe (2000): Potassium channel structure: domain by domain. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **10**: 456-461.
- C. Brugnara, L. De Franceschi und S. L. Alper (1993): Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J.Clin.Invest.* **92**: 520-526.
- K. G. Chandy und G. A. Gutman (1993): Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends.Pharmacol.Sci.* **14**: 434.
- B. H. Choi, J. S. Choi, S. W. Jeong, S. J. Hahn, S. H. Yoon, Y. H. Jo und M. S. Kim (2000): Direct block by bisindolylmaleimide of rat Kv1.5 expressed in Chinese hamster ovary cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **293**: 634-640.
- M. A. Cousin, T. C. Tan und P. J. Robinson (2001): Protein phosphorylation is required for endocytosis in nerve terminals: potential role for the dephosphins dynamin I and synaptojanin, but not AP180 or amphiphysin. *J.Neurochem.* **76**: 105-116.
- A. W. Cuthbert, M. E. Hickman, P. Thorn und L. J. MacVinish (1999): Activation of Ca<sup>2+</sup>- and cAMP-sensitive K<sup>+</sup> channels in murine colonic epithelia by 1-ethyl-2-benzimidazolone. *Am.J.Physiol.* **277**: C111-C120.

- C. DERST UND A. KARSCHIN (1998): Evolutionary link between prokaryotic and eukaryotic K<sup>+</sup> channels. *J.Exp.Biol.* 201: 2791-2799.
- D. C. DEVOR, A. K. SINGH, R. J. BRIDGES UND R. A. FRIZZELL (1996): Modulation of Cl<sup>-</sup> secretion by benzimidazolones. II. Coordinate regulation of apical GCl and basolateral GK. *Am.J.Physiol.* 271: L785-L795.
- D. C. DEVOR, A. K. SINGH, R. A. FRIZZELL UND R. J. BRIDGES (1996): Modulation of Cl<sup>-</sup> secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel. *Am.J.Physiol.* 271: L775-L784.
- D. C. DEVOR, A. K. SINGH, A. C. GERLACH, R. A. FRIZZELL UND R. J. BRIDGES (1997): Inhibition of intestinal Cl<sup>-</sup> secretion by clotrimazole: direct effect on basolateral membrane K<sup>+</sup> channels. *Am.J.Physiol.* 273: C531-C540.
- D. C. DEVOR, A. K. SINGH, L. C. LAMBERT, A. DELUCA, R. A. FRIZZELL UND R. J. BRIDGES (1999): Bicarbonate and chloride secretion in Calu-3 human airway epithelial cells. *J.Gen.Physiol.* 113: 743-760.
- J. DIETRICH, X. HOU, A. M. WEGENER UND C. GEISLER (1994): CD3 gamma contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor. *EMBO J.* 13: 2156-2166.
- D. A. DOYLE, CABRAL J. MORAIS, R. A. PFUETZNER, A. KUO, J. M. GULBIS, S. L. COHEN, B. T. CHAIT UND R. MACKINNON (1998): The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77.
- P. M. DUNN (1998): The action of blocking agents applied to the inner face of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels from human erythrocytes. *J.Membr.Biol.* 165: 133-143.
- M. J. DUNNE (1994): Phorbol myristate acetate and ATP-sensitive potassium channels in insulin-secreting cells. *Am.J.Physiol.* 267: C501-C506.
- F. ENTSCHLADEN, B. NIGGEMANN, K. S. ZANKER UND P. FRIEDL (1997): Differential requirement of protein tyrosine kinases and protein kinase C in the regulation of T cell locomotion in three-dimensional collagen matrices. *J.Immunol.* 159: 3203-3210.
- B. FAKLER, U. BRANDLE, E. GLOWATZKI, S. WEIDEMANN, H. P. ZENNER UND J. P. RUPPERSBERG (1995): Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K<sup>+</sup> channels is caused by intracellular spermine. *Cell* 80: 149-154.
- C. M. FANGER, S. GHANSHANI, N. J. LOGSDON, H. RAUER, K. KALMAN, J. ZHOU, K. BECKINGHAM, K. G. CHANDY, M. D. CAHALAN UND J. AIYAR (1999): Calmodulin mediates Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J.Biol.Chem.* 274: 5746-5754.

- 
- I. FINDLAY (1994): Interactive regulation of the ATP-sensitive potassium channel of cardiac muscle. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **24**: S6-11.
- A. FINGERHUT, K. VON FIGURA UND S. HONING (2001): Binding of AP2 to sorting signals is modulated by AP2 phosphorylation. *J.Biol.Chem.* **276**: 5476-5482.
- M. L. GARCIA, H. G. KNAUS, P. MUNUJOS, R. S. SLAUGHTER UND G. J. KACZOROWSKI (1995): Charybdotoxin and its effects on potassium channels. *Am.J.Physiol.* **269**: C1-10.
- G. GARDOS (1958): The function of  $Ca^{2+}$  in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim.Biophys.Acta* **30**: 653-654.
- A. C. GERLACH, N. N. GANGOPADHYAY UND D. C. DEVOR (2000): Kinase-dependent regulation of the intermediate conductance,  $Ca^{2+}$ -dependent potassium channel, hIK1. *J.Biol.Chem.* **275**: 585-598.
- A. C. GERLACH, C. A. SYME, L. GILTINAN, J. P. ADELMAN UND D. C. DEVOR (2001): ATP-dependent activation of the intermediate conductance,  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel, hIK1, is conferred by a C-terminal domain. *J.Biol.Chem.* **276**: 10963-10970.
- S. GHANSHANI, H. WULFF, M. J. MILLER, H. ROHM, A. NEBEN, G. A. GUTMAN, M. D. CAHALAN UND K. G. CHANDY (2000): Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J.Biol.Chem.* **275**: 37137-37149.
- S. GRISSMER, A. N. NGUYEN, J. AIYAR, D. C. HANSON, R. J. MATHER, G. A. GUTMAN, M. J. KARMILOWICZ, D. D. AUPERIN UND K. G. CHANDY (1994): Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated  $K^+$  channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5 and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol.Pharmacol.* **45**: 1227-1234.
- A. GRUPE, K. H. SCHROTER, J. P. RUPPERSBERG, M. STOCKER, T. DREWES, S. BECKH UND O. PONGS (1990): Cloning and expression of a human voltage-gated potassium channel. A novel member of the RCK potassium channel family. *EMBO J.* **9**: 1749-1756.
- O. P. HAMILL, A. MARTY, E. NEHER, B. SAKMANN UND F. J. SIGWORTH (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**: 85-100.
- L. HEGINBOTHAM UND R. MACKINNON (1992): The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron* **8**: 483-491.
- B. HILLE (1992): Ionic channels of excitable membranes, Sunderland, MA, MA: Sinauer. 2<sup>nd</sup> ed.

- S. M. HUBER, J. TSCHOP, G. S. BRAUN, W. NAGEL UND M. F. HORSTER (1999): Bradykinin-stimulated Cl<sup>-</sup> secretion in T84 cells. Role of Ca<sup>2+</sup>-activated hSK4-like K<sup>+</sup> channels. *Pflügers Arch.* **43**: 53-60.
- T. M. ISHII, C. SILVIA, B. HIRSCHBERG, C. T. BOND, J. P. ADELMAN UND J. MAYLIE (1997): A human intermediate conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**: 11651-11656.
- I. I. ISMAILOV UND D. J. BENOS (1995): Effects of phosphorylation on ion channel function. *Kidney Int.* **48**: 1167-79
- L. Y. JAN UND Y. N. JAN (1997): Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu.Rev.Neurosci.* **20**: 91-123.
- B. S. JENSEN, D. STROBAEK, P. CHRISTOPHERSEN, T. D. JORGENSEN, C. HANSEN, A. SILAHTAROGLU, S. P. OLESEN UND P. K. AHRING (1998): Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *Am.J.Physiol.* **275**: C848-C856.
- B. S. JENSEN, N. ODUM, N. K. JORGENSEN, P. CHRISTOPHERSEN UND S. P. OLESEN (1999): Inhibition of T cell proliferation by selective block of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**: 10917-10921.
- W. J. JOINER, L. Y. WANG, M. D. TANG UND L. K. KACZMAREK (1997): hSK4, a member of a novel subfamily of Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**: 11013-11018.
- W. J. JOINER, M. D. TANG, L. Y. WANG, S. I. DWORETZKY, C. G. BOISSARD, L. GAN, V. K. GRIBKOFF UND L. K. KACZMAREK (1998): Formation of intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels by interaction of Slack and Slo subunits. *Nat.Neurosci.* **1**: 462-469.
- J. E. KEEN, R. KHAWALED, D. L. FARRENS, T. NEELANDS, A. RIVARD, C. T. BOND, A. JANOWSKY, B. FAKLER, J. P. ADELMAN UND J. MAYLIE (1999): Domains responsible for constitutive and Ca<sup>2+</sup>-dependent interactions between calmodulin and small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels. *J.Neurosci.* **19**: 8830-8838.
- R. KHANNA, M. C. CHANG, W. J. JOINER, L. K. KACZMAREK UND L. C. SCHLICHTER (1999): hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J.Biol.Chem.* **274**: 14838-14849.
- M. KOHLER, B. HIRSCHBERG, C. T. BOND, J. M. KINZIE, N. V. MARRION, J. MAYLIE UND J. P. ADELMAN (1996): Small-conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* **273**: 1709-1714.

- R. KOHLER, C. DEGENHARDT, M. KUHN, N. RUNKEL, M. PAUL UND J. HOYER (2000): Expression and function of endothelial  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in human mesenteric artery: A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study in situ. *Circ.Res.* **87**: 496-503.
- H. KOMATSU, H. MIENO, K. TAMAKI, M. INOUE, G. KAJIYAMA UND I. SEYAMA (1996): Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels by  $\text{Mg}^{2+}$  and ATP in frog oocyte cells. *Pflügers Arch.* **431**: 494-503.
- D. E. KRANTZ, C. WAITES, V. OORSCHOT, Y. LIU, R. I. WILSON, P. K. TAN, J. KLUMPERMAN UND R. H. EDWARDS (2000): A phosphorylation site regulates sorting of the vesicular acetylcholine transporter to dense core vesicles. *J.Cell Biol.* **149**: 379-396.
- E. KRUG UND A. H. JR TASHJIAN (1987): Time-dependent changes in protein kinase C distribution and disappearance in phorbol ester-treated human osteosarcoma cells. *Cancer Res.* **47**: 2243-2246.
- E. KRUG, H. P. BIEMANN UND A. H. JR TASHJIAN (1987): Evidence for increased synthesis as well as increased degradation of protein kinase C after treatment of human osteosarcoma cells with phorbol ester. *J.Biol.Chem.* **262**: 11852-11856.
- R. LATORRE, A. OBERHAUSER, P. LABARCA UND O. ALVAREZ (1989): Varieties of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels. *Annu.Rev.Physiol.* **51**: 385-399.
- F. LESAGE, E. GUILLEMARE, M. FINK, F. DUPRAT, M. LAZDUNSKI, G. ROMÉY UND J. BARHANIN (1996): TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying  $\text{K}^+$  channel with a novel structure: *EMBO J.* **15**: 1004-1011.
- P. E. LIGHT, C. BLADEN, R. J. WINKFEIN, M. P. WALSH UND R. J. FRENCH (2000): Molecular basis of protein kinase C-induced activation of ATP-sensitive potassium channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**: 9058-9063.
- N. J. LOGSDON, J. KANG, J. A. TOGO, E. P. CHRISTIAN UND J. AIYAR (1997): A novel gene, hKCa4, encodes the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channel in human T lymphocytes. *J.Biol.Chem.* **272**: 32723-32726.
- C.F. LO UND R. NUMANN (1998): Independent and exclusive modulation of cardiac delayed rectifying  $\text{K}^+$  current by protein kinase C and protein kinase A. *Circ Res.* **16**: 995-1002.
- R. MACKINNON (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**, 232-235.
- R. MACKINNON, R. W. ALDRICH UND A. W. LEE (1993): Functional stoichiometry of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **262**: 757-759.

- F. MAINGRET, M. FOSSET, F. LESAGE, M. LAZDUNSKI UND E. HONORE (1999): TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K<sup>+</sup> channel. *J.Biol.Chem.* **274**: 1381-1387.
- J. MARTEL, G. DUPUIS, P. DESCHENES UND M. D. PAYET (1998): The sensitivity of the human Kv1.3 (hKv1.3) lymphocyte K<sup>+</sup> channel to regulation by PKA and PKC is partially lost in HEK 293 host cells. *J.Membr.Biol.* **161**: 183-196.
- D. MCHUGH, E. M. SHARP, T. SCHEUER UND W. A. CATTERALL (2000): Inhibition of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**: 12334-12338.
- P. MEERA, M. WALLNER, M. SONG UND L. TORO (1997): Large conductance voltage- and Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**: 14066-14071.
- M. MORI, T. KONNO, T. OZAWA, M. MURATA, K. IMOTO UND K. NAGAYAMA (2000): Novel interaction of the voltage-dependent sodium channel (VDSC) with calmodulin: does VDSC acquire calmodulin-mediated Ca<sup>2+</sup>-sensitivity? *Biochemistry* **39**: 1316-1323.
- E. NEHER UND B. SAKMANN (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**: 799-802.
- C. B. NEYLON, R. J. LANG, Y. FU, A. BOBIK UND P. H. REINHART (1999): Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in vascular smooth muscle: relationship between K(Ca) channel diversity and smooth muscle cell function. *Circ.Res.* **85**: e33-e43.
- M. S. NIELSEN, R. WARTH, M. BLEICH, B. WEYAND UND R. GREGER (1998): The basolateral Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel in rat colonic crypt cells. *Pflügers Arch.* **435**: 267-272.
- A. NOBLE, J. P. TRUMAN, B. VYAS, M. VUKMANOVIC-STEJIC, W. J. HIRST UND D. M. KEMENY (2000): The balance of protein kinase C and Ca<sup>2+</sup> signaling directs T cell subset development. *J.Immunol.* **164**: 1807-1813.
- J. OKAZAKI, K. MAWATARI, B. LIU UND K. C. KENT (2000): The effect of protein kinase C and its alpha subtype on human vascular smooth muscle cell proliferation, migration and fibronectin production. *Surgery* **128**: 192-197.
- Y. ONO, T. FUJII, K. IGARASHI, T. KUNO, C. TANAKA, U. KIKKAWA UND Y. NISHIZUKA (1989): Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86**: 4868-4871.

- E. P. ORRINGER, D. S. BLYTHE, A. E. JOHNSON, G. JR PHILLIPS, G. J. DOVER UND J. C. PARKER (1991): Effects of hydroxyurea on hemoglobin F and water content in the red blood cells of dogs and of patients with sickle cell anemia. *Blood* **78**: 212-216.
- K. A. PEDERSEN, R. L. SCHRODER, B. SKAANING-JENSEN, D. STROBAEK, S. P. OLESEN UND P. CHRISTOPHERSEN (1999): Activation of the human intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel by 1-ethyl-2-benzimidazolinone is strongly  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent. *Biochim.Biophys.Acta* **1420**: 231-240.
- K. A. PEDERSEN, N. K. JORGENSEN, B. S. JENSEN UND S. P. OLESEN (2000): Inhibition of the human intermediate-conductance,  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel by intracellular acidification. *Pflügers Arch.* **440**: 153-156.
- M. PELLEGRINO, M. PELLEGRINI, P. BIGINI UND A. SCIMEMI (1989): Properties of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in erythrocytes from patients with myotonic muscular dystrophy. *Muscle Nerve* **21**: 1465-1472.
- M. PELLEGRINO UND M. PELLEGRINI (1998): Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels of human erythrocytes by endogenous cAMP-dependent protein kinase. *Pflügers Arch.* **436**: 749-756.
- T. L. PENA, S. H. CHEN, S. F. KONIECZNY UND S. G. RANE (2000): Ras/MEK/ERK Up-regulation of the fibroblast  $\text{KCa}$  channel FIK is a common mechanism for basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta suppression of myogenesis. *J.Biol.Chem.* **275**: 13677-13682.
- O. PONGS (1999): Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Lett.* **452**: 31-35.
- H. RAUER, M. D. LANIGAN, M. W. PENNINGTON, J. AIYAR, S. GHANSHANI, M. D. CAHALAN, R. S. NORTON UND K. G. CHANDY (2000): Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets  $\text{Ca}^{2+}$ -activated over voltage-gated  $\text{K}^+$  channels. *J.Biol.Chem.* **275**: 1201-1208.
- J. REINHARDT, N. GOLENHOFEN, O. PONGS, H. OBERLEITHNER UND A. SCHWAB (1998): Migrating transformed MDCK cells are able to structurally polarize a voltage-activated  $\text{K}^+$  channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**: 5378-5382.
- P. H. REINHART UND I. B. LEVITAN (1995): Kinase and phosphatase activities intimately associated with a reconstituted  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent potassium channel. *J.Neurosci.* **15**: 4572-4579.
- R. ROBITAILLE, E. M. ADLER UND M. P. CHARLTON (1993):  $\text{Ca}^{2+}$  channels and  $\text{Ca}^{2+}$ -gated potassium channels at the frog neuromuscular junction. *J.Physiol.Paris.* **87**: 15-24.

- D. RON UND M. G. KAZANIETZ (1999): New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* **13**: 1658-1676.
- R. K. SAIKI, D. H. GELFAND, S. STOFFEL, S. J. SCHARF, R. HIGUCHI, G. T. HORN, K. B. MULLIS UND H. A. ERLICH (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- J. SAMBROOK, E. F. FRITSCH, UND T. MANIATIS (1989): Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- G. I. SANDLE, G. WARHURST, I. BUTTERFIELD, N. B. HIGGS UND R. B. LOMAX (1999): Somatostatin peptides inhibit basolateral potassium channels in human colonic crypts. *Am.J.Physiol.* **277**: G967-G975.
- M. C. SANGUINETTI UND A. ZOU (1997): Molecular physiology of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channels. *Heart Vessels* **12**: 170-172.
- M. C. SANGUINETTI (1999): Dysfunction of delayed rectifier potassium channels in an inherited cardiac arrhythmia. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **868**: 406-413.
- S. W. SCHNEIDER, P. PAGEL, C. ROTSCH, T. DANKER, H. OBERLEITHNER, M. RADMACHER UND A. SCHWAB (2000): Volume dynamics in migrating epithelial cells measured with atomic force microscopy. *Pflügers Arch.* **439**: 297-303.
- H. SCHRAMEK, D. WILFLINGSIEDER, V. POLLACK, R. FREUDINGER, S. MILDENBERGER UND M. GEKLE (1997): Ochratoxin A-induced stimulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 is associated with Madin-Darby canine kidney-C7 cell dedifferentiation. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **283**: 1460-1468.
- R. L. SCHRODER, B. S. JENSEN, D. STROBAEK, S. P. OLESEN UND P. CHRISTOPHERSEN (2000): Activation of the human, intermediate-conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel by methylxanthines. *Pflügers Arch.* **440**: 809-818.
- M. A. SCHUMACHER, A. F. RIVARD, H. P. BACHINGER UND J. P. ADELMAN (2001): Structure of the gating domain of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel complexed with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *Nature* **410**: 1120-1124.
- A. SCHWAB, H. J. WESTPHALE, L. WOJNOWSKI, S. WUNSCH UND H. OBERLEITHNER (1993): Spontaneously oscillating K<sup>+</sup> channel activity in transformed Madin-Darby canine kidney cells. *J.Clin.Invest.* **92**: 218-223.
- A. SCHWAB, J. GEIBEL, W. WANG, H. OBERLEITHNER UND G. GIEBISCH (1993): Mechanism of activation of K<sup>+</sup> channels by minoxidil-sulfate in Madin-Darby canine kidney cells. *J.Membr.Biol.* **132**: 125-136.

- 
- A. SCHWAB, L. WOJNOWSKI, K. GABRIEL UND H. OBERLEITHNER (1994): Oscillating activity of a  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive  $\text{K}^+$  channel. A prerequisite for migration of transformed Madin-Darby canine kidney focus cells. *J.Clin.Invest.* **93**: 1631-1636.
- A. SCHWAB, K. GABRIEL, F. FINSTERWALDER, G. FOLPRECHT, R. GREGER, A. KRAMER UND H. OBERLEITHNER (1995): Polarized ion transport during migration of transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Pflügers Arch.* **430**: 802-807.
- A. SCHWAB UND H. OBERLEITHNER (1996): Plasticity of renal epithelial cells: the way a potassium channel supports migration. *Pflügers Arch.* **432**: R87-R93.
- A. SCHWAB, F. FINSTERWALDER, U. KERSTING, T. DANKER UND H. OBERLEITHNER (1997): Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  distribution in migrating transformed epithelial cells. *Pflügers Arch.* **434**: 70-76.
- A. SCHWAB, J. REINHARDT, S. W. SCHNEIDER, B. GASSNER UND B. SCHURICHT (1999):  $\text{K}^+$  channel-dependent migration of fibroblasts and human melanoma cells. *Cell Physiol.Biochem.* **9**: 126-132.
- A. SCHWAB, B. SCHURICHT, P. SEEGER, J. REINHARDT UND P. C. DARTSCH (1999): Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by  $\text{K}^+$  channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume. *Pflügers Arch.* **438**: 330-337.
- A. SCHWAB (2001): Ion channels and transporters on the move: *News Physiol.Sci.* **16**: 29-33.
- A. SCHWAB, A. WULF, C. SCHULZ, J. REINHARDT, D. WEINHOLD, S. C. HEBERT UND S. SILBERNAGL (2001): Subcellular distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive  $\text{K}^+$  channels (IK1) in migrating cells. eingereicht.
- A. SCHWAB (2001): Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am.J.Physiol.Renal Physiol.* **280**: F739-F747.
- N. A. SHARKEY, K. L. LEACH UND P. M. BLUMBERG (1984): Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **81**: 607-610.
- M. SHINDO, Y. IMAI UND Y. SOHMA (2000): A novel type of ATP block on a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel from bullfrog erythrocytes. *Biophys.J.* **79**: 287-297.
- D. J. SNYDERS (1999): Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc.Res.* **42**: 377-390.
- C. A. SYME, A. C. GERLACH, A. K. SINGH UND D. C. DEVOR (2000): Pharmacological activation of cloned intermediate- and small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* **278**: C570-C581.

- K. TAGUCHI, K. KANEKO UND T. KUBO (2000): Protein kinase C modulates Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cultured rat mesenteric artery smooth muscle cells. *Biol.Pharm.Bull.* **23**: 1450-1454.
- J. XU, W. YU, Y. N. JAN, L. Y. JAN UND M. LI (1995): Assembly of Voltage-gated potassium channels. *J Biol Chem.* **20**: 24761-8.
- C. G. TEPPER, S. JAYADEV, B. LIU, A. BIELAWSKA, R. WOLFF, S. YONEHARA, Y. A. HANNUN UND M. F. SELDIN (1995): Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**: 8443-8447.
- Y. TONG, G. BRANDT, M. LI, G. SHAPOVALOV, E. SLIMKO, A. KARSCHIN, D. DOUGHERTY UND H. LESTER (2001): Tyrosine decaging leads to substantial membrane trafficking during modulation of an inward rectifier potassium channel. *J.Gen.Physiol.* **117**: 103-118.
- J. D. TROADEC, S. THIRION, D. PETTURITI, M. T. BOHN UND P. POUJEOL (1999): ATP acting on P2Y receptors triggers Ca<sup>2+</sup>-mobilization in primary cultures of rat neurohypophysial astrocytes (pituicytes). *Pflügers Arch.* **437**: 745-753.
- T. TZOUNOPOULOS, J. MAYLIE UND J. P. ADELMAN (1995): Induction of endogenous channels by high levels of heterologous membrane proteins in *Xenopus* oocytes. *Biophys.J.* **69**: 904-908.
- T. TZOUNOPOULOS, J. MAYLIE UND J. P. ADELMAN (1998): Gating of I(sK) channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys.J.* **74**: 2299-2305.
- D. H. VANDORPE, B. E. SHMUKLER, L. JIANG, B. LIM, J. MAYLIE, J. P. ADELMAN, L. DE FRANCESCHI, M. D. CAPPELLINI, C. BRUGNARA UND S. L. ALPER (1998): cDNA cloning and functional characterization of the mouse Ca<sup>2+</sup>-gated K<sup>+</sup> channel, mIK1. Roles in regulatory volume decrease and erythroid differentiation. *J.Biol.Chem.* **273**: 21542-21553.
- C. VERGARA, R. LATORRE, N. V. MARRION UND J. P. ADELMAN (1998): Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels. *Curr.Opin.Neurobiol.* **8**: 321-329.
- C. VERGARA, O. ALVAREZ UND R. LATORRE (1999): Localization of the K<sup>+</sup> lock-In and the Ba<sup>2+</sup> binding sites in a voltage-gated Ca<sup>2+</sup>-modulated channel. Implications for survival of K<sup>+</sup> permeability. *J.Gen.Physiol.* **114**: 365-376.
- A. WEI, T. JEGLA UND L. SALKOFF (1996): Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* **35**: 805-829.

- H. WULFF, M. J. MILLER, W. HANSEL, S. GRISSMER, M. D. CAHALAN UND K. G. CHANDY (2000): Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**: 8151-8156.
- X. M. XIA, B. FAKLER, A. RIVARD, G. WAYMAN, T. JOHNSON-PAIS, J. E. KEEN, T. ISHII, B. HIRSCHBERG, C. T. BOND, S. LUTSENKO, J. MAYLIE UND J. P. ADELMAN (1998): Mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  gating in small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels. *Nature* **395**: 503-507.
- J. YANG, M. YU, Y. N. JAN UND L. Y. JAN (1997): Stabilization of ion selectivity filter by pore loop ion pairs in an inwardly rectifying potassium channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**: 1568-1572.
- S. P. YU UND G. A. KERCHNER (1998): Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J.Neurosci.Res.* **52**: 612-617.
- G. ZHU, Z. QU, N. CUI UND C. JIANG (1999): Suppression of Kir2.3 activity by protein kinase C phosphorylation of the channel protein at threonine 53. *J Biol Chem.* **274**: 11643-6.

## 7. Anhang

### 7.1 Aminosäuresequenz des cIK1

	<b>S1</b>	
MGGELVPGLG	ALQRRKRLLE	QEKWLAGWAL ALAGIGIGLM VLHA EMLWFG
	<b>S2</b>	
GCPWALYLFL	VKCMISISTF	LLLCLIVAFH AKEVQLFMTD NGLRDWRVAL
	<b>S3</b>	
TGRQAAQIVL	ELAVCGLHPA	PVRGPPCAQG LGSPPTATQS WPGFLDEGEA
	<b>S4</b>	
LLSLAMLLRL	YLVPRVLLR	SGVLLNASYR SIGALNQVRF RHWFVAKLYM
	<b>S5</b>	<b>P</b>
NTHPGRLLLC	LTLGLWLTTA	WVLSVAERQA VNATGHLSDT LWLIPITFLT
	<b>S6</b>	
IGYGDVVPGT	MWGKIVCLCT	GVMGVCCTAL LVAVVARKLE FNKAEKVVHN
	<b>CBD</b>	
FMMDIQYAKE	MKESAAARVLQ	EAWMFYKHTR RKDRGAARKH QRLLLA INR
FRQVRLKHRK	LREQVNSMVD	ISKMHMILCD LQLGLSSSHQ ALEKRMDALA
GKLDLTELLE	STALGSRQVP	EPSQEAT
		424

**Abb.23: Aminosäuresequenz des cIK1**

Die hydrophoben, putativ membranspannenden Bereiche (S1 - S6), die Porenregion (P) und die Calmodulin-bindende-Domäne sind durch Schattierungen gekennzeichnet

## 7.2 Vergleich der Aminosäuresequenz von IK1-Kanälen

```

cIK1:  MGGELVPGLGALQRRKRLLEQEKWLAGWALALAGIGIGLMVLHAEMLWFGGCPW
hIK1:  MGGDLVLGLGALRRRKRLLLEQEKSLAGWALVLAGTGIGLMVLHAEMLWFGGCSW
Maus:  MGGELVTGLGALRRRKRLLLEQEKRVAGWALVLAGTGIGLMVLHAEMLWFLGCKW
rIK1:  MGGELVTGLGALRRRKRLLLEQEKRVAGWALVLAGTGIGLMVLHAEMLWFLGCKW

cIK1:  ALYLFLVKMISISTFLLLCLIVAFHAKEVQLFMTDNGLRDWRVALTGRQAAQI
hIK1:  ALYLFLVKCTISISTFLLLCLIVAFHAKEVQLFMTDNGLRDWRVALTGRQAAQI
mIK1:  VLYLLLVKCLITLSTAFLLCLIVVFHAKEVQLFMTDNGLRDWRVALTRRQVAQI
rIK1:  VLYLLLVKCLITLSTAFLLCLIVVFHAKEVQLFMTDNGLRDWRVALTRRQVAQI

cIK1:  VLELAVCGLHPAPVRGPPCAQGLGSPPTATQSWPGFLDEGEALLSLAMLLRLYL
hIK1:  VLELVVCGLHPAPVRGPPCVQDLGAPLTSQPWPFGFLGQGEALLSLAMLLRLYL
mIK1:  LLELLVCGVHPVPLRSPHC--ALAGEATDAQPWPFGFLGEGEALLSLAMLLRLYL
rIK1:  LLELLVCGVHPVPLRSPHC--TLAGEATDSQAWPGFLGEGEALLSLAMLLRLYL

cIK1:  VPRAVLLRSGVLLNASYRSIGALNQVRFRHWFVAKLYMNTHPGRLLLCLTLGLW
hIK1:  VPRAVLLRSGVLLNASYRSIGALNQVRFRHWFVAKLYMNTHPGRLLLGLTLGLW
mIK1:  VPRAVLLRSGVLLNASYRSIGALNQVRFRHWFVAKLYMNTHPGRLLLGLTLGLW
rIK1:  VPRAVLLRSGVLLNASYRSIGALNQVRFRHWFVAKLYMNTHPGRLLLGLTLGLW

cIK1:  LTTAWVLSVAERQAVNATGHLSDTLWLIPITFLTIGYGDVVPGTMWGKIVCLCT
hIK1:  LTTAWVLSVAERQAVNATGHLSDTLWLIPITFLTIGYGDVVPGTMWGKIVCLCT
mIK1:  LTTAWVLSVAERQAVNATGHLTDTLWLIPITFLTIGYGDVVPGTMWGKIVCLCT
rIK1:  LTTAWVLSVAERQAVNATGHLTDTLWLIPITFLTIGYGDVVPGTLWGKIVCLCT

cIK1:  GVMGVCCTALLVAVVARKLEFNKAEKHVHNFMMDIQYAKEMKESAAARVLQEAWM
hIK1:  GVMGVCCTALLVAVVARKLEFNKAEKHVHNFMMDIQYTKEMKESAAARVLQEAWM
mIK1:  GVMGVCCTALLVAVVARKLEFNKAEKHVHNFMMDIHYAKEMKESAAARLLQEAWM
rIK1:  GVMGVCCTALLLAVVARKLEFNKAEKHVHNFMMDIHYAKEMKESAAARLLQEAWM

cIK1:  FYKHTRRKDRGAARKHQRRLLAAINRFRQVRLKHRKLRQVNSMVDISKMHMIL
hIK1:  FYKHTRRKESHAAARRHQKLLAAINAFRQVRLKHRKLRQVNSMVDISKMHMIL
mIK1:  YYKHTRRKDSRAARRHQKMLAAIHTFRQVRLKHRKLRQVNSMVDISKMHMIL
rIK1:  YYKHTRRKDSRAARRHQKMLAAIHTFRQVRLKHRKLRQVNSMVDISKMHMIL

cIK1:  CDLQGLGLSSSHQALEKRMDALAGKLDLTLELLSTALGSRQVPEPSQEAT
hIK1:  YDLQONLSSSHRALEKQIDTLAGKLDALTELLSTALGPRQLPEPSQQSK
mIK1:  CDLQGLGLSSSHRALEKRIDGLAGKLDALTELLGTALQQQQLPEPSQEAT
rIK1:  CDLQGLGLSASHLALEKRIHGLARKLDALTELLSAL-QQQPPEPIQEAT

```

**Abb.24: Aminosäuresequenzvergleich von cIK1, hIK1, mIK1 und rIK1**

Nicht konservierte Aminosäuren sind fett hervorgehoben. Die PKC-Phosphorylierungsstellen sind durch Schattierungen gekennzeichnet. Die in der Aminosäuresequenz des Menschen, der Maus und der Ratte konservierte PKA-Phosphorylierungsstelle ist durch einen Rahmen markiert.

---

## 7.3 Abkürzungen

Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Kollektion
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bidest	bidestilliert
BIM	Bisindolylmaleimid
BK	Ca <sup>2+</sup> -empfindlicher Kaliumkanal großer Leitfähigkeit
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	"copy" Desoxyribonukleinsäure
CHO	Hamster-Zelllinie
cIK1	Ca <sup>2+</sup> empfindlicher Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit des Hundes
Clt	Clotrimazol
Ctx	Charybdotoxin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
E.coli	Escherichia coli
1-EBIO	1-Ethyl-2-Benzimidazol
EDTA	Ethylenglycol-bis[β-Aminoethylether]N,N,N',N'-Tetraacetat
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)tetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure])

---

hIK1	Ca <sup>2+</sup> -empfindlicher Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit des Menschen
Ibx	Iberiotoxin
IK1	Ca <sup>2+</sup> -empfindlicher Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit
KATP	ATP regulierter Kaliumkanal
Kir	einwärtsrektifizierender Kaliumkanal
Kv	spannungsabhängiger Kaliumkanal
LB	Luria-Broth
MEM	Minimal Essentiell Medium
MDCK	Zelllinie aus dem Nierenepithel des Hundes (Madin-Darby Canine Kidney)
MDCK-F	transformierte Zelllinie aus dem Nierenepithel des Hundes
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
nt	Nukleotid(e)
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte (x = Wellenlänge in nm)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetate
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SK	Ca <sup>2+</sup> empfindlicher Kaliumkanal geringer Leitfähigkeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TM	Schmelztemperatur
U	Enzymaktivitätseinheit
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
vgl.	vergleiche
V <sub>m</sub>	Membranpotential
VDCC	spannungsabhängiger Ca <sup>2+</sup> -Kanal
Urev	Umkehrpotential

## 7.4 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Albrecht Schwab herzlich für die Bereitstellung des Themas und sein großes persönliches Engagement während meiner Arbeit danken. Seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die kritische Durchsicht meines Manuskriptes haben mir sehr geholfen.

Herrn Prof. Dr. Benz möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Arbeit als externe Promotion zu betreuen.

Herrn Prof. Dr. Michael Gekle danke ich für die geduldige und freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit, sowie für viele lehrreiche Diskussionen.

Für die gute Zusammenarbeit im Labor und interessante Diskussionen nicht nur über fachliche Themen bedanke ich mich bei Dr. Christoph Sauvant und Dr. Gerald Schwerdt. Herrn Prof. Dr. Stefan Silbernagl und allen Mitarbeitern am Lehrstuhl I des Physiologischen Institutes danke ich für die guten Arbeitsbedingungen und das freundliche Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt Frau Birgit Gassner, die mir in vielerlei Hinsicht immer wieder geholfen hat und mit der es großen Spaß gemacht hat zusammenzuarbeiten.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Andreas Benesic, mit dem ich viele fruchtbare Diskussionen führen konnte und der mich gerade in der letzten Phase meiner Arbeit stark unterstützt hat.

Und schließlich bedanke ich mich bei meinen Eltern und meinen Freunden, besonders Gisa Boehden, Jens Kollas, Dr. Verena Pollmann und Dr. Ulrike Bischoff für ihre nimmermüde Unterstützung während der letzten Jahre.