

**Aus dem Institut für Pharmakologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Martin Lohse**

**Modulation der Einwärtsgleichrichtung von GIRK-Kanälen durch G-Protein
Untereinheiten**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Leif Hommers

aus La Jolla

Würzburg, November 2008

Referent: Prof. Dr. Martin Lohse

Koreferent: Prof. Dr. Manfred Heckmann

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2009

Der Promovend ist Arzt

1.	Einleitung	1
1.1.	Begriffsdefinitionen	1
1.1.1.	Konformation	1
1.1.2.	Membranpotential	1
1.2.	Biophysikalische Grundlagen	2
1.2.1.	Entstehung des Membranpotentials	2
1.2.2.	Ionenkanäle	4
1.2.3.	Kalium-Kanäle	5
1.3.	Signaltransduktion	8
1.3.1.	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	8
1.3.2.	G-Proteine	9
1.4.	G-Protein-gekoppelte einwärtsgerichtete Kalium-Kanäle	12
1.4.1.	Aufbau und physiologische Bedeutung	12
1.4.2.	Physikalische Charakterisierung des GIRK-Kanals	13
1.4.3.	Mechanismus der Einwärtsrichtung	14
1.4.4.	Interaktion von G-Proteinen mit GIRK-Kanälen	15
1.4.5.	Mechanismus der Aktivierung des GIRK-Kanals durch G $\beta\gamma$ -Dimere	17
1.5.	Zielsetzung	18
2.	Methoden	21
2.1.	Verzeichnis verwendeter Lösungen und Chemikalien	21
2.1.1.	Medien für Bakterienkultur	21
2.1.2.	Medien für eukaryote Zellkultur	21
2.1.3.	Puffer für Molekularbiologie	22
2.1.4.	Extrazellulärlösung für Patch-Clamp-Experimente	22
2.1.5.	Intrazellulärlösung für Patch-Clamp-Experimente	22
2.2.	Biologisches Material und Zellkultur	23
2.2.1.	Eukaryote Zellsysteme	23
2.2.2.	Prokaryote Zellsysteme	23
2.2.3.	Eukaryote Zellkultur	23
2.2.4.	Prokaryote Zellkultur	23
2.2.5.	Enzyme	24

2.2.6.	Plasmid DNA	24
2.3.	Molekularbiologische Methoden	25
2.3.1.	DNA-Transformation	25
2.3.2.	DNA-Präparation	25
2.3.3.	DNA-Aufreinigung	25
2.3.4.	Subklonierung von GIRK-141- und GIRK-414-Konstrukt von Bluescript-Vektor in pCDNA3-Vektor	26
2.3.5.	DNA-Transfektion	26
2.3.6.	Etablierung einer HEK-293-Zelllinie, die GIRK-1 und GIRK-4 stabil exprimiert	27
2.4.	Elektrophysiologische Methoden	27
2.4.1.	Prinzip der Patch-Clamp-Methodik	27
2.4.2.	Durchführung	28
2.5.	Software	29
3.	Ergebnisse	30
3.1.	Das Verhältnis der Expression von G β γ -Dimer zu GIRK-Kanal beeinflusst die mittlere Stärke der Einwärtsgleichrichtung	30
3.2.	Stöchiometrisches Verhältnis von G β γ -Dimeren zu GIRK-Kanälen bei schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen	33
3.3.	Polyamine und Mg ²⁺ -Ionen blockieren den GIRK-Kanal unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen nicht mit reduzierter Affinität	35
3.4.	Extrazelluläre Ba ²⁺ -Ionen blockieren den GIRK-Kanal unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen mit reduzierter Affinität	38
3.5.	Cs ⁺ -Ionen blockieren GIRK-Kanäle unter schwach einwärtsgleichrichten- den Bedingungen mit reduzierter Affinität	40
4.	Diskussion	45
4.1.	Die Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung des GIRK-Kanals ist Folge der Bindung von G β γ -Dimeren	45
4.2.	Der GIRK-Kanal-Block durch Polyamine und Mg ²⁺ -Ionen ist unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen nicht verändert	47

4.3.	GIRK-Kanäle werden durch Ba ²⁺ - und Cs ⁺ -Ionen unter schwach einwärts- gleichrichtenden Bedingungen mit geringerer Affinität blockiert	48
4.4.	Bindung von Gβγ-Dimeren induziert vermutlich eine Konformations- änderung nahe des Selektivitätsfilters des GIRK-Kanals	50
4.5.	Ein Modell für das gating des GIRK-Kanals	51
4.6.	Ausblick - Änderung des gating-Schaltverhaltens von GIRK-Kanälen unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen	53
5.	Zusammenfassung	55
6.	Literaturverzeichnis	56
7.	Abkürzungsverzeichnis	64

1. Einleitung

1.1. Begriffsdefinitionen

1.1.1. Konformation

Die Konformation eines organischen Moleküls beschreibt die räumliche Anordnung der drehbaren Bindungen der Kohlenstoff-Atome dieses Moleküls und dadurch die räumliche Anordnung der Atome dieses Moleküls. Ein Protein, das aus einer Vielzahl von Aminosäuren besteht, welche jeweils mindestens eine solche drehbare Bindung haben, kann daher aus chemischer Sicht eine Vielzahl an Konformationen annehmen.

Für physiologische Betrachtungen muss aber meistens nicht zwischen all diesen chemischen Konformationen unterschieden werden, denn sie spielen funktional häufig die gleiche Rolle.

Um das Verständnis zu erleichtern wird in dieser Arbeit der Begriff „Konformation“ immer im Sinne von „physiologischer Konformation“ verwendet und steht stellvertretend für die Gesamtheit aller chemischen Konformationen, die eine gleiche Funktion des Proteins erzeugen.

1.1.2. Membranpotential

An einer Zellmembran bildet eine ungleiche intra- und extrazelluläre Ionenkonzentration ein chemisches Potential und eine ungleiche intra- und extrazelluläre Verteilung von Ladungen ein elektrisches Potential. Der Begriff „Membranpotential“ wird in vorliegender Arbeit synonym zum Begriff „elektrisches Potential“ und der Begriff „Konzentrationsgradient“ synonym zum Begriff „chemisches Potential“ verwendet.

1.2. Biophysikalische Grundlagen

1.2.1. Entstehung des Membranpotentials

Verschiedene Transportprozesse sind am Aufbau des Membranpotentials einer Zelle beteiligt. Aktive, transmembranäre Transportproteine, wie z.B. die Na/K-ATPase, können Ionen durch Hydrolyse von ATP zwischen Intra- und Extrazellulärraum entlang ihrer oder auch gegen ihre elektro-chemischen Gradienten transportieren. Passive, transmembranäre Transportproteine, wie z.B. Ionenkanäle, machen die Zellmembran für ein oder mehrere Ionen permeabel und hydrolysieren für den Transport kein ATP. Ionen können durch passive Transportproteine die Zellmembran daher nur entlang ihrer und nicht gegen ihre elektro-chemischen Gradienten passieren (Prinzip der erleichterten Diffusion). Durch das Zusammenspiel verschiedener Transportsysteme hält eine Zelle chemische Konzentrationsgradienten für Ionen (chemisches Potential) zwischen Intra- und Extrazellulärraum weitgehend konstant.

Das Prinzip der Entstehung des Membranpotentials soll an einem einfachen Beispiel erklärt werden: eine Membran soll nur für ein Ion permeabel sein und zwei Kompartimente mit verschieden konzentrierten Lösungen des gleichen Salzes trennen. Der Diffusion folgend entsteht durch die Membran ein Strom des Ions, für das die Membran permeabel ist. Dieser Strom fließt vom höher zum niedriger konzentrierten Kompartiment. Dies bedingt eine Ungleichverteilung von Ladungsträgern zwischen beiden Kompartimenten, was wiederum zu einem elektrischen Potential an der Membran führt (Membranpotential). Das elektrische Potential (Membranpotential) liegt gemäß der Energieerhaltung entgegengesetzt zum chemischen Potential (Konzentrationsgradient). Der Ionenstrom fließt zwischen beiden Kompartimenten, bis das elektrische Potential und das chemische Potential im Gleichgewicht stehen (Gibbs-Donan-Gleichgewicht, Gleichgewichtspotential).

Die Entstehung des Membranpotentials verhält sich analog zur Aufladung eines Kondensators mit Elektronen. Eine Spannungsquelle verteilt Elektronen ungleich auf beide Platten des Kondensators, bis das elektrische Feld im Kondensator mit dem elektrischen Potential der Spannungsquelle im Gleichgewicht steht. Tabelle 1 zeigt die korrespondierenden Elemente.

Tabelle 1: Gegenüberstellung der einander entsprechenden Elemente bei der Entstehung des Membranpotentials an einer Zellmembran und der Ladung eines Kondensators

Zellmembran	Kondensator
Membran	Kondensatorplatten
Konzentrationsgradient (Chemisches Potential)	Elektrische Spannung der Spannungsquelle
Ionen	Elektronen
Membranpotential (Elektrisches Potential)	Elektrisches Feld (Potential) im Kondensator

Bei der Betrachtung des Membranpotentials einer lebenden Zelle müssen zum einen mehrere Ionen mit verschiedenen chemischen Potentialen und zum anderen unterschiedliche Ionenkanäle berücksichtigt werden. Die chemischen Potentiale der verschiedenen Ionen wirken nur auf das jeweilige Ion und sind daher unabhängig voneinander. Das resultierende Membranpotential hingegen wirkt auf alle Ionen gleichzeitig. Das Membranpotential entsteht als Folge eines komplexen Zusammenspiels zwischen den Leitfähigkeiten der Kanäle und Transportproteine und den chemischen Potentialen der einzelnen Ionen. Eine genaue Analyse dieses Zusammenspiels erscheint für die durchgeführten Untersuchungen nicht erforderlich. Es genügt, das Modell der Zellmembran als elektrischer Kondensator zu erweitern. In diesem erweiterten Modell wird der Kondensator mit mehreren Spannungsquellen (die die chemischen Potentiale der einzelnen Ionen repräsentieren) parallel geschaltet. Jede der Spannungsquellen ist mit je einem Widerstand (der die Leitfähigkeit für das entsprechende Ion ausdrückt) in Serie geschaltet (Klinke et al., 1996). Die elektrische Ladung des Kondensators hängt demnach sowohl von den Spannungsquellen als auch von den eingestellten Widerständen ab.

Die physiologische Bedeutung des Membranpotentials liegt unter anderem in der Informationsübermittlung an Axonen und Muskeln, in der Schrittmacherfunktion im Herzen, in der Energiespeicherung und -erzeugung der Atmungskette und in der Steuerung von Transport- und Osmoseprozessen (z.B. in der Niere oder in Drüsenendstücken) (Klinke et al., 1996; Hille et al., 2001; Schmidt et al., 2007).

Die vorliegenden Untersuchungen sind an Kalium-Kanälen durchgeführt worden. Das physiologische Gleichgewichtspotential für Kalium liegt der Nernst-Gleichung entsprechend bei ca. -90 mV (von intrazellulär nach extrazellulär definiert), resultierend aus der intrazellulär höheren Kalium-Konzentration von ca. 140 mM und extrazellulär niedrigeren Kalium-Konzentration von ca. 5 mM (Klinke et al., 1996; Hille et al., 2001; Schmidt et al., 2007).

1.2.2. Ionenkanäle

Ionenkanäle sind passive, transmembranäre Transportproteine. Sie leiten im offenen Funktionszustand Ionen selektiv oder unselektiv entlang ihres elektrochemischen Gradienten (erleichterte Diffusion). Für eine korrekte physiologische Funktion muss ein Ionenkanal Strukturmerkmale aufweisen, die ihn fest in der Membran verankern (Transmembrandomänen), die eine Beeinflussung der „Öffnung“ zulassen (Bindungsstellen für Liganden, „gate“) und die festlegen, für welche Ionen der Kanal selektiv ist (Selektivitätsfilter).

Ein Kanal hat zwei Funktionszustände: geschlossen oder offen. Im offenen Funktionszustand werden Ionen wie durch einen ohmschen Widerstand geleitet. Physikalisch charakterisiert jeden Kanal die Leitfähigkeit im offenen Funktionszustand und die Wahrscheinlichkeit seines offenen Funktionszustandes. Das Überführen des Kanals in Konformationen, die seinen offenen Funktionszustand wahrscheinlicher machen, nennt man Aktivierung.

Den Prozess des Öffnens und Schließens des Kanals bezeichnet man als „gating“. Die Teile der Aminosäuresequenz eines Kanals, die den Wechsel zwischen offenem und geschlossenem Funktionszustand vermitteln, werden als „gate“ bezeichnet. Im einfachsten Fall gibt es nur ein gate und nur einen gating-Mechanismus pro Ionenkanal.

Sowohl der offene als auch der geschlossene Funktionszustand können durch verschiedene, funktional nicht gleichwertige Konformationen bedingt werden. Ionenkanäle wechseln typischerweise sehr schnell zwischen offenem und geschlossenem Funktionszustand. Sie können beide Funktionszustände für unterschiedlich lange Zeitintervalle einnehmen (Hille et al., 2001). Um die Wahrscheinlichkeit des offenen Funktionszustandes zu beschreiben, werden die Zeitintervalle gemessen, in denen der Kanal offen ist (Offenzeiten), und gemäß ihrer Häufigkeit in einem Histogramm dargestellt (Wahrscheinlichkeitsverteilung der Offenzeiten). Zeigt diese Wahrscheinlichkeitsverteilung mehrere Maxima, ist dies ein Hinweis auf verschiedene, funktional nicht gleichwertige, offene Konformationen eines Kanals (Hille et al., 2001).

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Offenzeiten kann durch sehr viele Faktoren beeinflusst werden. Typische Beispiele sind: Proteine (u.a. Untereinheiten von G-Proteinen), kleine Moleküle (u.a. cAMP, Ionen wie Calcium oder Liganden wie Acetylcholin oder GABA), das Membranpotential, mechanische Scherkräfte, die Temperatur oder der pH-Wert. Einen Sonderfall nimmt die Blockade des Kanals in offener Konformation durch Teile seiner eigenen Struktur oder intrazelluläre bzw. extrazelluläre Ionen, kleine Moleküle oder Proteine ein (Klinke et al., 1996; Hille et al., 2001; Schmidt et al., 2007).

Physiologisch werden die meisten Kanäle in ihrer Aktivität überwiegend von einem Faktor reguliert. Je nach Faktor spricht man von spannungsabhängigen Kanälen, von G-Protein-gekoppelten Kanälen oder von Ionen-gesteuerten Kanälen.

1.2.3. Kalium-Kanäle

Kalium-Kanäle folgen in ihrem strukturellen Aufbau dem allgemeinen Schema von Kationen-Kanälen: sie setzen sich aus vier Untereinheiten zu einem Hetero- oder Homotetramer zusammen. Anhand des strukturellen Aufbaus lassen sich die Kalium-Kanäle nach Anzahl der Transmembrandomänen ihrer Untereinheiten in drei Hauptgruppen einteilen, wie in Abbildung 1 dargestellt.

Die vier Untereinheiten eines Kanals bilden zusammen eine symmetrische Pore in der Zellmembran. Am extrazellulären Ende dieser Pore liegt der Selektivitätsfilter des

Kanals. Er wird aus den sogenannten P-Domänen der vier Kanaluntereinheiten gebildet. Er bestimmt, welche Ionen der Kanal leitet. Entsprechend ihrer ähnlichen physiologischen Funktion ist in dieser P-Domäne fast allen Kalium-Kanälen die Aminosäuresequenz Glyzin-Tyrosin-Glyzin gemeinsam (Heginbotham et al., 1994). Aufgrund der symmetrischen Anordnung der vier P-Domänen eines Kalium-Kanals kann die Hydrathülle eines Kalium-Ions mittels der Carbonylreste dieser drei Aminosäuren vollständig ersetzt werden. In Folge der physikalisch-chemischen Eigenschaften eines jeden Ions ist die Hydrathülle für jedes Ion verschieden. Hierauf beruht die Selektivität des Kalium-Kanals: die Hydrathülle anderer Ionen kann am Selektivitätsfilter des Kalium-Kanals nur in Ausnahmefällen ersetzt werden (Hille et al., 2001; Schmidt et al., 2007).

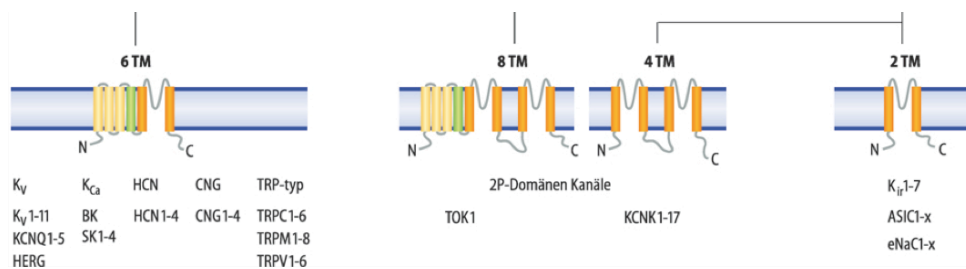


Abbildung 1: Einteilung der verschiedenen Kalium-Kanäle in 3 Hauptgruppen

(I) Kanäle, die Tetramere aus vier Untereinheiten mit je 6 Transmembrandomänen (6 TM) sind. Zu dieser Gruppe gehören u.a. die spannungsabhängigen Kalium-Kanäle (K_v) und die Calcium-gesteuerten Kalium-Kanäle (K_{Ca}).

(II) Kanäle, die sich aus zwei Tandemdimern (bestehend aus je 2 fusionierten Untereinheiten) zusammensetzen. Es gibt Tandemdimere, die sich aus einer Untereinheit mit 6 Transmembrandomänen und einer Untereinheit mit 2 Transmembrandomänen zusammensetzen (8 TM), und Tandemdimere, die sich aus zwei Untereinheiten mit je 2 Transmembrandomänen zusammensetzen (4 TM). Jeweils zwei 8 TM- oder zwei 4 TM-Tandemdimere setzen sich zu einem Kanal zusammen. Funktional stellen diese Kanäle eine heterogene Gruppe dar.

(III) Kanäle, die Tetramere aus Untereinheiten mit je 2 Transmembrandomänen sind. Zu dieser Gruppe gehören u.a. die einwärtsgerichteten Kalium-Kanäle (K_{ir}).

Bei jeder Gruppe sind darüber hinaus in gängiger Abkürzung weitere Kanäle der entsprechenden Gruppe angegeben. Abbildung modifiziert nach (Schmidt et al., 2007).

Die vorliegenden Untersuchungen beschäftigen sich mit einwärtsgerichteten Kalium-Kanälen. Daher sei der Begriff „einwärtsgerichtet“ erläutert: einwärtsgerichtete Kalium-Kanäle leiten K^+ -Ionen bei einem negativ vom Kalium-Gleichgewichtspotential gelegenen Membranpotential mit hoher Leitfähigkeit und bei einem positiv vom Kalium-Gleichgewichtspotential gelegenen Membranpotential mit

niedriger Leitfähigkeit (Nichols et al., 1997). K^+ -Ionen fließen also hauptsächlich in „Einwärtsrichtung“ in die Zelle – sie werden nach einwärts „gleichgerichtet“. Man unterscheidet stark und schwach einwärtsgerichtende Kanäle, je nachdem, wie stark der Strom in Auswärtsrichtung ist.

Ein Strukturmodell für einwärtsgerichtende Kalium-Kanäle ist in Abbildung 2 gezeigt: die Kristallstruktur des Kcs-Kanals von *Streptomyces lividans*, wie sie zum Zeitpunkt der experimentellen Durchführung der Arbeit bekannt war (Doyle et al., 1998). Die Aminosäuresequenz dieses Kanals hat eine hohe Homologie zu der Sequenz humaner einwärtsgerichtender Kalium-Kanäle und wurde daher als Prototyp für strukturelle Überlegungen in der Arbeit verwendet.

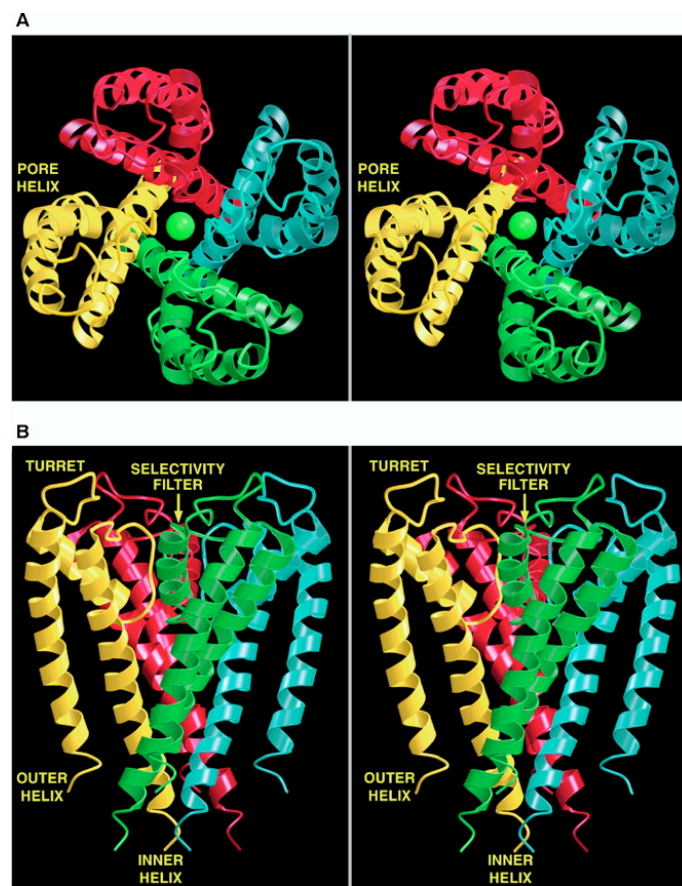


Abbildung 2: Stereoview-Modell des Kcs-Kanals

(A) Ansicht des Kanals von extrazellulärer Seite auf den Selektivitätsfilter. Jede der vier Kanaluntereinheiten ist in einer anderen Farbe dargestellt. Der zentrale Punkt stellt ein K^+ -Ion im Kanal dar. (B) Seitliche Ansicht des Kanals. Die Transmembrandomänen erzeugen eine Pore in der Membran. Im Inneren der Pore (am extrazellulären Ende) liegt der Selektivitätsfilter. Strukturen außerhalb der Zellmembran sind strukturell nicht dargestellt worden (Doyle et al., 1998).

Anmerkung: Stereoview bedeutet, dass der räumliche Eindruck bei Fixation des Auge in die Ferne mittels Fusion des rechten und linken Bildes zu einem mittleren, dritten Bild erreicht wird.

1.3. Signaltransduktion

1.3.1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (englisch „G protein coupled receptors“; Kurzform GPCR, als Plural wird häufig GPCRs verwendet) sind die derzeit größte bekannte Familie von Hormon- und Neurotransmitter-Rezeptoren (Weis et al., 2008). Ihre Aufgabe ist es, extrazelluläre Signale, die durch Bindung eines Transmitters (auch Ligand genannt) an eine Zelle herangetragen werden, nach intrazellulär weiterzuleiten. Sie spielen physiologisch eine zentrale Rolle bei der Wahrnehmung von Licht-, Geruchs- und Geschmacksreizen, Signalvermittlung an Synapsen, Hormonwirkung, Entzündungsreaktion und Chemotaxis, sowie bei Zelldifferenzierung und Wachstum (Pierce et al., 2002; Schmidt et al., 2007). Den vielseitigen physiologischen Funktionen entsprechend gibt es eine Vielzahl von Liganden für GPCRs, die von kleinen Molekülen wie Acetylcholin, Noradrenalin oder Serotonin bis zu komplexeren Hormonen wie Thyroxin oder sogar Peptidhormonen wie Parathormon reichen.

Vereinfacht betrachtet befindet sich ein Rezeptor – analog zu einem Ionenkanal – im aktiven oder im inaktiven Funktionszustand. Die Bindung eines Liganden an einen GPCR kann nun das Gleichgewicht zwischen den Funktionszuständen des GPCRs modulieren. Man unterscheidet vier Klassen von Liganden gemäß des Einflusses den eine Bindung auf die Wahrscheinlichkeit ausübt, mit der der aktive Funktionszustand vorliegt (Kenakin et al., 2002; Kobilka et al., 2007):

- 1.) Volle Agonisten: Bei Bindung an einen Rezeptor wird dieser mit maximaler Wahrscheinlichkeit in aktivem Funktionszustand stabilisiert. Hierunter fallen typischerweise physiologische Liganden.
- 2.) Partielle Agonisten: Bei Bindung an einen Rezeptor wird dieser mit submaximaler Wahrscheinlichkeit in aktivem Funktionszustand stabilisiert.
- 3.) Antagonisten: Die Bindung an einen Rezeptor beeinflusst nicht die Wahrscheinlichkeit, mit der der Rezeptor einen aktiven Funktionszustand einnimmt.
- 4.) Inverse Agonisten: Die Bindung an einen Rezeptor reduziert die Wahrscheinlichkeit, mit der der Rezeptor einen aktiven Funktionszustand einnimmt.

Im aktiven Funktionszustand kann ein GPCR an seiner intrazellulären Seite G-Proteine binden und aktivieren, wie in Abschnitt 1.3.2. detailliert erklärt wird. Hierbei erscheinen insbesondere Strukturen am intrazellulären C-Terminus und an der dritten intrazellulären Schleife (Kobilka, 2007) von Relevanz. Welche chemischen Konformationen zu dem aktiven und zu dem inaktiven Funktionszustand bei Bindung verschiedener Liganden führen ist Gegenstand der Forschung (Rosenbaum et al., 2009). Gegenwärtig unterscheidet man fünf Klassen von GPCRs, deren Proteinstrukturen und Funktionen Gemeinsamkeiten aufweisen (Fredriksson et al., 2003): (I) Klasse der Rhodopsin-ähnlichen GPCRs, (II) Klasse der Sekretin-GPCRs, (III) Klasse der Glutamat-GPCRs, (IV) Klasse der Adhensions-GPCRs und (V) Klasse der Frizzled-taste2-GPCRs. Man unterteilt GPCRs dieser Klassen ferner nach ihrem physiologischen Liganden und dem Subtyp der von ihnen aktivierten G-Proteine. In den Untersuchungen wurden Rezeptoren verwendet, die der Klasse der Rhodopsin-ähnlichen GPCRs entstammen. Die Bindung des Liganden findet bei Rezeptoren dieser Klasse typischerweise an Aminosäureresten der Transmembrandomänen statt (Ji et al., 1998; Kobilka, 2007). Insbesondere für Rhodopsin sind die Konformationsänderungen bei Rezeptoraktivierung untersucht worden. Demnach bedeutet „Aktivierung“ eine Bewegung der dritten und der sechsten Transmembrandomäne, die sich auf die dritte und zweite intrazelluläre Schleife des Rezeptors auswirkt (Hubbell et al., 2003). Es kommt an der intrazellulären Seite des Rhodopsins dazu, dass bei „Aktivierung“ eine Bindung zwischen TM3 und TM6 („ionic lock“ genannt) aufgebrochen wird, wodurch der C-Terminus einer $G\alpha$ -Untereinheit an Opsin binden kann (Scheerer et al., 2008). Aktuelle Forschung versucht diese Prozesse genauer aufzuklären.

1.3.2. G-Proteine

G-Proteine sind Proteine, die das Signal eines Rezeptors intrazellulär zu Effektorproteinen weiterleiten. Sie sind heterotrimere Proteine, die sich aus je einer $G\alpha$ -, $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheit zusammensetzen. Weil sie an ihrer $G\alpha$ -Untereinheit Guanin-Nukleotide binden können, werden sie G-Proteine genannt. Die Bindung des Nukleotids bestimmt den Funktionszustand eines G-Proteins: hat die $G\alpha$ -Untereinheit

ein GTP gebunden, ist das G-Protein im aktiven Funktionszustand; hat die $G\alpha$ -Untereinheit ein GDP gebunden, ist das G-Protein im inaktiven Funktionszustand.

Aktive GPCRs vermitteln die Aktivierung von G-Proteinen. Für die Interaktion zwischen GPCR und G-Protein existieren gegenwärtig allerdings mehrere Modelle. Unter Annahme einer freien lateralen Diffusion von GPCRs und G-Proteinen in der Zellmembran könnten diese rein zufällig per Kollision interagieren, auch als „collision-coupling“ bezeichnet (Tolkovsky et al., 1978; Hein et al. 2005). Während einer Interaktion zwischen aktivem GPCR und inaktivem G-Protein würde nach diesem Modell das G-Protein aktiviert werden. Als ein alternatives Modell gelten Komplexe aus GPCR und G-Protein (Neubig, 1994). Welche Form der Interaktion letztendlich vorliegt ist Gegenstand der Forschung und wird sowohl vom Rezeptor- als auch vom G-Protein Subtyp abhängen. Es können neben den genannten Extremen zwischen „starr“ und „frei“ auch alle anderen Möglichkeiten vorkommen.

Gesichert ist, dass inaktive G-Proteine mit hoher Affinität an aktive GPCRs binden. In diesem Komplex ist die Affinität des G-Proteins für GDP erniedrigt und GDP kann aus der Bindung diffundieren (Brandt et al., 1986). Der resultierende Komplex aus aktivem GPCR und nukleotidfreiem G-Protein ist sehr stabil, und wird daher auch „ternary complex“ genannt (De Lean et al., 1980). Das G-Protein zeigt in ihm eine gleich hohe Affinität für GDP und GTP (Heck et al., 2001). Da GTP in der Zelle in höherer Konzentration als GDP vorliegt, bindet das nukleotidfreie G-Protein nun mit hoher Wahrscheinlichkeit GTP (Gilman, 1987). Geschieht dies, ist das G-Protein aktiviert. Aktivierte G-Proteine zeigen dann typischerweise eine niedrige Affinität zu aktiven GPCRs, was die Interaktion mit Effektorproteinen ermöglicht.

Ob aktivierte G-Proteine als Heterotrimer vorliegen oder ob sie in $G\alpha$ -Untereinheit und ein $G\beta\gamma$ -Dimer dissoziieren ist Gegenstand aktueller Untersuchungen und wird kontrovers diskutiert (Lambert, 2008). Es gibt hierzu momentan konkurrierende Modelle: statt dem Zerfall des Trimers könnte die Aktivierung des G-Proteins auch eine Veränderung der Konformation bewirken, wie es für G_i/o wahrscheinlich erscheint (Bünemann et al., 2003; Cabrera-Vera et al., 2003). Es wurden sowohl für GTP-beladene $G\alpha$ -Untereinheiten als auch für $G\beta\gamma$ -Dimere verschiedene Effektorproteine identifiziert, was nahelegt, dass die Untereinheiten dissoziieren (Lambert, 2008). Allerdings wurde auch beschrieben, dass es bei fixer Fusion von $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ dennoch

zu einer Interaktion mit einem Effektorprotein kommen kann (Klein et al., 2000). Die physiologische Rolle von inaktiven, GDP-beladenen G-Proteinen wird gegenwärtig erforscht.

Neben einer Weiterleitung des Signals ist eine weitere Aufgabe der $G\alpha$ -Untereinheit die Bestimmung der Spezifität des G-Proteins für bestimmte GPCRs und Effektorproteine. Strukturell wird dies hauptsächlich durch einzelne Aminosäuren im C- und N-Terminus und in der α -helikalen Domäne der $G\alpha$ -Untereinheit festgelegt (Cabrera-Vera et al., 2003). Der Spezifität ihrer α -Untereinheit folgend werden G-Proteine in die Gruppen G_i/o , G_s , $G_q/11$ und $G_{12/13}$ unterteilt (Simon et al., 1991). Für die folgende Untersuchung ist die G_i/o -Gruppe von Relevanz, die spezifisch die Adenylatcyclase hemmt, und sowohl die cGMP Phosphodiesterase als auch verschiedene Ionenkanäle (u.a. den untersuchten GIRK-Kanal; siehe 1.4.1.) aktivieren kann (Lambert, 2008). Auch für die $G\beta$ -Untereinheit und $G\gamma$ -Untereinheit wurde eine Vielzahl von genetischen Subtypen gefunden (Simon et al., 1991). Sowohl $G\alpha$ - als auch $G\gamma$ -Untereinheit durchlaufen posttranslational eine Lipidmodifikation, wodurch sie in der Zellmembran verankert werden. Die Interaktion von $G\beta\gamma$ mit $G\alpha$ wird nach gegenwärtigem Kenntnisstand durch eine Interaktion der Switch-Regionen und des N-Terminus von $G\alpha$ mit $G\beta$ vermittelt (Oldham et al., 2008).

Eine dritte Aufgabe der $G\alpha$ -Untereinheit ist die zeitliche Begrenzung des weitergeleiteten Signals. Dies vermittelt die GTPase-Funktion der $G\alpha$ -Untereinheit: GTP kann von der GTPase in GDP und einen Phosphatrest hydrolysiert werden, wodurch das aktive G-Protein inaktiviert wird (Stryer, 1986). Die GTPase-Funktion kann durch verschiedene Proteine reguliert werden. Die physiologisch wichtigste Klasse sind RGS-Proteine (englisch „regulators of G protein signaling“, Kurzform RGS), die zu einer Beschleunigung der GTPase-Funktion beitragen, indem sie wie ein Katalysator einen intermediären Zustand der GTP-Hydrolyse energetisch stabilisieren (Ross et al., 2000).

Für die Methodik der Untersuchungen soll eingeführt werden, dass es möglich ist, ein künstliches Protein molekularbiologisch herzustellen, in dem der intrazelluläre C-Terminus eines GPCRs mit dem N-Terminus von $G\alpha$ verbunden ist. Korrekt durchgeführt weist dieses „GPCR- $G\alpha$ -Fusionsprotein“ eine physiologische Signalweiterleitung auf und zeichnet sich dadurch aus, dass sowohl eine 1:1

Stöchiometrie als auch eine räumlich fixierte Entfernung zwischen GPCR und $G\alpha$ vorliegen (Seifert et al., 1999).

1.4. G-Protein-gekoppelte einwärtsgleichrichtende Kalium-Kanäle

1.4.1. Aufbau und physiologische Bedeutung

G-Protein-gekoppelte einwärtsgleichrichtende Kalium-Kanäle (englisch G-protein-coupled inwardly rectifying K^+ channels; kurz GIRK channels) werden hauptsächlich in den supraventrikulären Myozyten des Herzens und postsynaptisch in verschiedenen Gebieten des Nervensystems exprimiert (Sakman et al., 1983; Wickman et al. 1999). Analog dem Aufbau aller Kalium-Kanäle setzen sich GIRK-Kanäle als Heterotetramer aus vier Untereinheiten zusammen. Es sind bisher fünf verschiedene Gene für GIRK-Kanal-Untereinheiten bekannt. GIRK-Kanäle am Herzen setzen sich aus je zwei GIRK-1- und entweder zwei GIRK-4- oder zwei GIRK-2-Untereinheiten zusammen (Krapivinsky et al., 1998). Im zentralen Nervensystem setzen sich GIRK-Kanäle aus je zwei GIRK-1- und entweder zwei GIRK-2- oder zwei GIRK-3-Untereinheiten zusammen (Dascal, 1997).

Durch Bindung von $G\beta\gamma$ -Dimeren der aktivierten G_i/o -Signalkaskade werden GIRK-Kanäle aktiviert (Krapivinsky et al., 1995). Dadurch können sie indirekt durch GPCRs reguliert werden und stabilisieren abhängig vom Grad ihrer Aktivierung das Ruhemembranpotential (Krapivinsky et al., 1995). Die Häufigkeit der Entstehung eines Aktionspotentials oder eines Schrittmacherpotentials wird daher mit steigender GIRK-Kanal-Aktivität gesenkt. GIRK-Kanäle scheinen hierdurch an der Vermittlung des negativ-chronotropen Effekts des N. vagus am Herzen beteiligt zu sein (Sakman et al., 1983; Yamada et al., 1998; Wickman et al. 1999).

Darüber hinaus sind GIRK-Kanäle bei der Vermittlung postsynaptischer, inhibitorischer Potentiale u.a. an GABAergen Neuronen im Hippocampus, an noradrenergen, opioidergen, serotoninerger oder somatostatinerger Neuronen im Locus coeruleus oder auch dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra beteiligt (Dascal, 1997). Dem GIRK-Kanal wird eine wesentliche Rolle bei der Opiat-vermittelten und möglicherweise auch bei der Ethanol-induzierten Analgesie zugesprochen (Ikeda et al.,

2002). Eine Rolle des GIRK-Kanals bei Epilepsie wird ebenfalls diskutiert, da in mehreren Untersuchungen das Knock-Out des Gens für GIRK-2-Untereinheiten bei Mäusen zu spontanen Krampfanfällen bzw. zu deren Häufung führte (Signorini et al., 1997; Wickenden, 2002).

1.4.2. Physikalische Charakterisierung des GIRK-Kanals

Die Einzelkanalleitfähigkeit des GIRK-Kanals in Einwärtsrichtung wird in der Literatur mit 25 - 33 pS angegeben (Takigawa et al., 1999).

Die Wahrscheinlichkeit mit der ein GIRK-Kanal sich im offenen Funktionszustand befindet, im folgenden als „Offenwahrscheinlichkeit des GIRK-Kanals“ bezeichnet, wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Physiologisch von zentraler Bedeutung ist die Aktivierung von GIRK-Kanälen durch die Bindung von G $\beta\gamma$ -Dimeren der aktivierten Gi/o-Signalkaskade (Krapivinsky et al., 1995; Krapivinsky et al. 1995); man spricht auch von Agonisten-abhängiger Aktivierung.

Weitere physiologische Faktoren, die die Offenwahrscheinlichkeit von GIRK-Kanälen erhöhen sind PIP₂, Na⁺-Ionen, ATP, Phosphorylierung durch Proteinkinase A (PKA) und möglicherweise Interaktionen mit Proteinen des Zytoskeletts (Dascal, 1997; Yamada et al., 1998; Sadjja et al., 2003). Die Offenwahrscheinlichkeit wird hingegen bei Kanal-Phosphorylierung durch Proteinkinase C (PKC), Kanal-Dephosphorylierung durch Phosphoprotein Phosphatase 2A (PP2A) und bei Bindung von Mg²⁺-Ionen oder Polyaminen reduziert (Medina et al., 2000; Sadjja et al., 2003; Mao et al., 2004). Na⁺-Ionen scheinen die Offenwahrscheinlichkeit direkt zu steigern. PIP₂ steigert sowohl die Aktivierbarkeit des GIRK-Kanals durch G $\beta\gamma$ -Dimere als auch die durch Na⁺-Ionen. Bezüglich der direkten Wirkung am GIRK-Kanal deuten Ergebnisse verschiedener Arbeiten darauf hin, dass PIP₂ den Kanal im offenen Funktionszustand stabilisieren kann und das ATP über eine Erhöhung der PIP₂ Konzentration in der Membran wirkt (Huang et al., 1998). Ebenfalls wurde beschrieben, dass eine Bindung von PIP₂ an den GIRK-Kanal eine Stabilisierung der Bindung von Na⁺-Ionen an den GIRK-Kanal bewirkt (Logothetis et al., 1999). Auf den Kanalblock durch Polyamine und Mg²⁺-Ionen wird in 1.4.3. eingegangen.

Ferner ist in *Xenopus* Oozyten beschrieben worden, dass die Koexpression von GIRK-Kanal und RGS4 die Kinetik der GIRK-Kanal Aktivierung und Deaktivierung bei Rezeptoraktivierung sehr stark beschleunigt (Doupnik et al., 1997).

Einwärtsgerichtete Kalium-Kanäle können durch Ba^{2+} -Ionen hochaffin und hochselektiv geblockt werden (Lancaster et al., 2000). Diese Eigenschaft spielt eine zentrale Rolle in der Versuchsdurchführung der vorliegenden Untersuchungen: werden von einer Zelle unter den einwärtsgerichteten Kalium-Kanälen überwiegend GIRK-Kanäle exprimiert, so entspricht der GIRK-Kanal-Strom dem Ionenstrom, der sich durch Ba^{2+} -Ionen reversibel blockieren lässt. Der GIRK-Kanal-Strom einer Zelle lässt sich demnach als Differenz aus den beiden Ionen-Strömen berechnen, die ohne und in Gegenwart von Ba^{2+} -Ionen gemessen werden können.

1.4.3. Mechanismus der Einwärtsrichtung

Die Einwärtsrichtung ist die wichtigste elektrophysiologische Eigenschaft des GIRK-Kanals. Sie besagt (wie in 1.2.3. eingeführt), dass K^+ -Ionen bei Membranpotentialen negativ des Kalium-Gleichgewichtspotentials bei hoher Leitfähigkeit und bei Membranpotentialen positiv des Kalium-Gleichgewichtspotentials bei niedriger Leitfähigkeit durch den Kanal fließen können. Für alle einwärtsgerichteten Kalium-Kanäle wird als Mechanismus der Einwärtsrichtung ein membranpotentialabhängiger (auch „spannungsabhängig“ genannter) Block des Kanals angenommen (Schmidt et al., 2007). Hierbei scheint das intrazelluläre Polyamin Spermin eine zentrale Rolle zu spielen: es kann bei einem Membranpotential positiv des Kalium-Gleichgewichtspotentials den Kanal von intrazellulärer Seite her blocken (Shyng et al., 1996). Darüberhinaus wird ein gleichartiger Block durch intrazelluläre Mg^{2+} -Ionen als weiterer Mechanismus diskutiert (Yamada et al., 1998).

Bei veränderter intra- und extrazellulärer K^+ -Konzentration und folglich verändertem Kalium-Gleichgewichtspotential verschiebt sich auch die Schwelle der Einwärtsrichtung zum neuen Kalium-Gleichgewichtspotential. Gegenwärtig wird diese Beobachtung damit erklärt, dass die blockierenden Moleküle mit K^+ -Ionen im GIRK-Kanal um gleiche Bindungsstellen am und im Selektivitätsfilter konkurrieren (Hille, 2001; Claydon et al., 2004; Makary et al., 2005). Als weitere Bindungsstellen für

Polyamine wurden Aminosäuren im C-Terminus, in der TM2-Helix und entlang der Kanalpore gefunden (Makary et al., 2006). Es ist noch nicht im Detail geklärt, wie der Block des Kanals an diesen Bindungsstellen entsteht.

Für die Versuchsauswertung in den vorliegenden Untersuchungen ist von Bedeutung, dass der Kanal-Block durch Polyamine langsam erfolgt und mit der verwendeten Patch-Clamp Technik zeitlich gemessen werden kann (Lopatin et al., 1994; Fakler et al., 1995; Nichols et al., 1997; Yamada et al., 1998). Der Kanal-Block durch Mg^{2+} -Ionen hingegen erfolgt sehr schnell, so dass er zeitlich nicht gemessen werden kann (Yamada et al., 1998).

Es sei angemerkt, dass Polyamine und Mg^{2+} -Ionen in zahlreichen weiteren zellulären Prozessen eine wichtige Rolle spielen, die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht detailliert besprochen werden können. Für Polyamine ist eine wesentliche Bedeutung für die Regulation des Zellzyklus und der Apoptose beschrieben, weswegen sie in der Tumorentstehung und -progression Gegenstand aktueller Forschung sind (Casero et al., 2009). Mg^{2+} -Ionen spielen eine zentrale Rolle als Kofaktor von biochemischen Reaktionen, bei denen Phosphatgruppen übertragen werden. Darüberhinaus stabilisiert Mg^{2+} sowohl DNA-Moleküle als auch die Zellmembran und ist ein unspezifischer Ionenkanalblocker. Neurophysiologisch scheint es als Ionenkanalblocker neben der erwähnten Einwärtsgleichrichtung auch eine zentrale Rolle in der Langzeit Potenzierung durch Block von NMDA-Rezeptoren zu spielen (Politi et al., 2003).

1.4.4. Interaktion von G-Proteinen mit GIRK-Kanälen

Die Aktivität von GIRK-Kanälen wird physiologisch im Wesentlichen über die Bindung von $G\beta\gamma$ -Dimeren reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass $G\beta\gamma$ -Dimere sowohl an den N- als auch an den C-Terminus von GIRK-Kanal-Untereinheiten binden (Inanobe et al., 1995; Kunkel et al., 1995; Huang et al., 1997; He et al., 1999) und dadurch zu einer Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals führen (Logothetis et al., 1987). Es können bis zu vier $G\beta\gamma$ -Dimere gleichzeitig an einen GIRK-Kanal binden; jede GIRK-Kanal-Untereinheit kann nur ein $G\beta\gamma$ -Dimer binden (Corey et al., 2001). Die Bindungen an die verschiedenen Kanaluntereinheiten scheinen funktional

nicht gleichwertig zu sein (Sadja et al., 2002). Näheres zum Mechanismus der Aktivierung von GIRK-Kanälen durch $G\beta\gamma$ -Dimere folgt in 1.4.5.

Die Aktivierung von GIRK-Kanälen steht physiologisch in direktem Zusammenhang mit der Aktivierung G_i/o -gekoppelter GPCRs, wie z.B. den muscarinergen M_2 -, den Adenosin A_1 -, den opioidergen μ - oder den in den Versuchen verwendeten adrenergen α_{2A} -Rezeptoren (Dascal, 1997). Sie wird durch die Bindung von $G\beta\gamma$ -Dimeren aktivierter G-Proteine G_i/o -gekoppelter Signalwege vermittelt. Ob und in welchem Ausmaß G-Proteine G_s -gekoppelter Signalwege für die Aktivierung von GIRK-Kanälen eine Rolle spielen, wird gegenwärtig kontrovers diskutiert. Phosphorylierung des GIRK-Kanals durch Proteinkinase A nach Aktivierung G_s -gekoppelter Signalwege steigert die „Aktivierbarkeit“ des GIRK-Kanals bei Aktivierung G_i/o -gekoppelter Signalwege (Sadja et al., 2003). Für $G\beta\gamma$ -Dimere aktivierter G-Proteine G_q -gekoppelter Signalwege scheint gesichert, dass sie den GIRK-Kanal nicht aktivieren können. Die Aktivierung G_q -gekoppelter GPCRs führt im Gegenteil zu einer Hemmung der GIRK-Kanal-Aktivität (Sharon et al., 1997), zum einen, da PIP_2 , das die Aktivität des GIRK-Kanals fördert, bei Aktivierung G_q -gekoppelter Signalwege aufgrund der Aktivierung von Phospholipase C vermehrt abgebaut wird (Kobrinisky et al., 2000; Sohn et al., 2007), zum anderen, da aus dem Abbau von PIP_2 in Diacylglycerin und den Anstieg intrazellulären Ca^{2+} eine Aktivierung der Proteinkinase C resultiert, die zu einer Phosphorylierung des GIRK-Kanals führt (Mao et al., 2004).

Für verschiedene $G\alpha$ -Subtypen G_i/o -gekoppelter Signalwege wurde gezeigt, dass $G\alpha$ -Untereinheiten, die ein GDP gebunden haben, an den N- und C-Terminus der GIRK-1- und GIRK-2-Untereinheit binden können. Diese Bindung scheint den GIRK-Kanal in seinem inaktiven Funktionszustand zu stabilisieren (Peleg et al., 2002). Wenn darüber hinaus auch inaktive heterotrimere G-Proteine an den GIRK-Kanal binden könnten, wie in einer aktuellen Untersuchung gezeigt (Riven et al., 2006), würde sich eine räumliche Eingrenzung des G-Protein-Signals auf seinen Effektor erklären lassen.

Abbildung 3 illustriert den Einfluss verschiedenener G-Protein-gekoppelter Signalwege auf die Aktivierung des GIRK-Kanals.

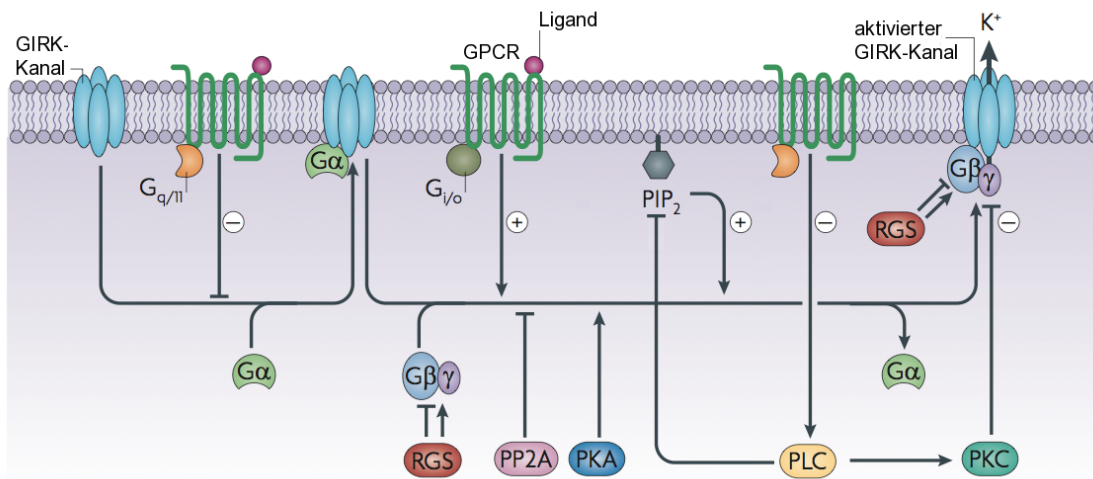


Abbildung 3: G-Protein gekoppelte Signalwege, die die Offenwahrscheinlichkeit des GIRK-Kanals modulieren

Membranproteine: In blau der GIRK-Kanal, links inaktiv, in der Mitte „primed“ durch Bindung einer $G\alpha_i$ -Untereinheit, rechts aktiviert bei Bindung von $G\beta\gamma$. GPCRs sind in grün illustriert, links und rechts ein Gq/11-gekoppelter GPCR, in der Mitte ein Gi/o-gekoppelter GPCR.

Die Aktivierung Gq/11-gekoppelter GPCRs aktiviert Phospholipase C (PLC), wodurch PIP_2 gespalten und Proteinkinase C (PKC) aktiviert wird. Der Abbau von PIP_2 verringert die GIRK-Kanal-aktivierende Wirkung von PIP_2 ; die Phosphorylierung durch PKC inhibiert den GIRK-Kanal. Die Aktivierung Gi/o-gekoppelter GPCRs steigert die GIRK-Kanal Aktivierung durch $G\beta\gamma$, ebenso die GIRK-Kanal Phosphorylierung durch Proteinkinase A (PKA) bei Aktivierung Gs-gekoppelter GPCR (nicht vollständig illustriert). Die Aktivierung der Phosphoprotein Phosphatase 2A (PP2A) inhibiert die GIRK-Kanal Aktivierung durch $G\beta\gamma$. Abbildung modifiziert nach (Lujan et al., 2009).

1.4.5. Mechanismus der Aktivierung des GIRK-Kanals durch $G\beta\gamma$ -Dimere

Der Mechanismus der GIRK-Kanal-Aktivierung durch $G\beta\gamma$ -Dimere ist noch nicht abschließend geklärt. Es wurde vorgeschlagen, dass die Bindung von $G\beta\gamma$ -Dimeren eine Rotation und Verschiebung der TM2-Helix der GIRK-Kanal-Untereinheiten verursachen könnte (Sadjja et al., 2001; Yi et al., 2001; Jin et al., 2002). Durch diese Rotation würde die räumliche Anordnung der GIRK-Kanal-Untereinheiten am intrazellulären Eingang zum Kanal so verändert, dass er sich öffnet.

Es konnte experimentell gezeigt werden, dass auch die extrazelluläre Seite des Kanals in die Kanalaktivierung involviert ist. Durch die Modifikation von Strukturen am Selektivitätsfilter und im extrazellulären Bereich des GIRK-Kanals konnte die Agonist-abhängige Aktivierung des GIRK-Kanals aufgehoben werden (Claydon et al., 2003; Xiao et al, 2003).

1.5. Zielsetzung

Die vorliegenden Untersuchungen wurden durchgeführt, da ein Experiment von M. Bünnemann ein nicht erwartetes Resultat zeigte (Hommers et al., 2003). Durch Acetylcholin können in feline Myozyten des Atriums über Stimulation muscarinerger GPCRs Gi/o-Proteine und in der Folge einwärtsgerichtete Kalium-Kanäle aktiviert werden (Dascal, 1997). In Whole-Cell-Patch-Clamp Experimenten sollte bei Stimulation mit $10\ \mu\text{M}$ und mit $0,1\ \mu\text{M}$ Acetylcholin die Abhängigkeit des Acetylcholin-aktivierbaren Kalium-Stroms vom Membranpotential untersucht werden. Die Versuche wurden bei einer extrazellulären Kalium-Konzentration von $20\ \text{mM}$ durchgeführt, weshalb das Kalium-Gleichgewichtspotential bei ca. $-50\ \text{mV}$ lag.

Erwartet wurde, dass im Vergleich zu $-90\ \text{mV}$ bei $+60\ \text{mV}$ Membranpotential gemäß der Einwärtsgleichrichtung nur minimale Kalium-Ströme fließen würden und dass im Vergleich zur Stimulation mit $0,1\ \mu\text{M}$ Acetylcholin die Ströme bei Stimulation mit $10\ \mu\text{M}$ Acetylcholin sowohl bei $-90\ \text{mV}$ als auch bei $+60\ \text{mV}$ um den gleichen Faktor zunehmen würden.

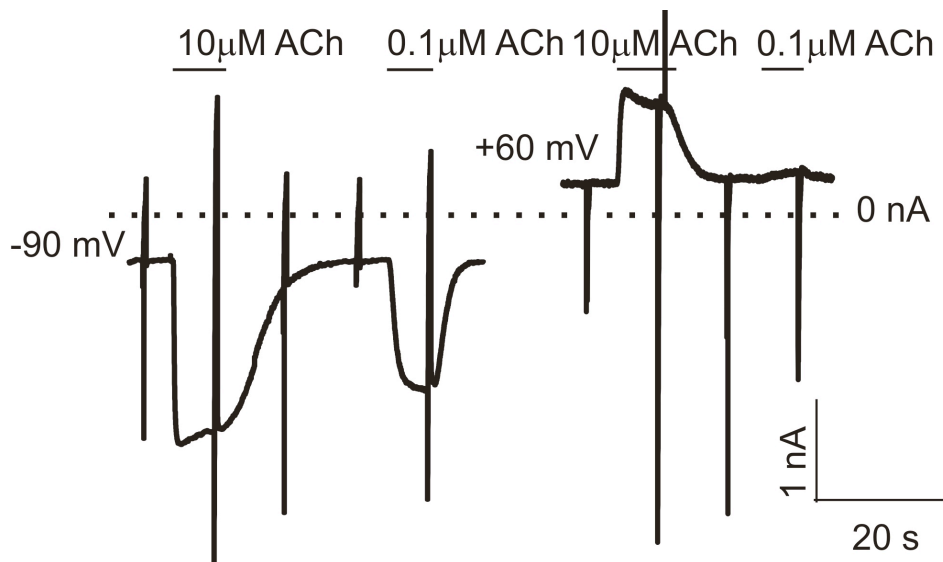


Abbildung 4: Membranstrom in feline atrialen Myozyten bei $-90\ \text{mV}$ und $+60\ \text{mV}$ in Abhängigkeit von der Stimulation mit Acetylcholin

Whole-Cell-Membranströme wurden an isolierten Myozyten unter Stimulation mit $10\ \mu\text{M}$ oder $0,1\ \mu\text{M}$ Acetylcholin (ACh) bei $-90\ \text{mV}$ und $+60\ \text{mV}$ Membranpotential gemessen. Verglichen zu $-90\ \text{mV}$ war bei $+60\ \text{mV}$ der Membranstrom unter $10\ \mu\text{M}$ Acetylcholin überproportional stärker. Die gestrichelte Linie repräsentiert $0\ \text{nA}$ Strom. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für vier weitere untersuchte Zellen. Abbildung modifiziert nach (Hommers et al., 2003).

Wie in Abbildung 4 illustriert, wurden diese Erwartungen nicht bestätigt. Vergleicht man bei beiden Membranpotentialen die Membranströme unter Stimulation mit 0,1 μM und 10 μM Acetylcholin miteinander, so nahm unter Stimulation mit 10 μM Acetylcholin der Membranstrom bei +60 mV Membranpotential überproportional zu. Mit Hilfe des Kanal-Blocks durch Ba^{2+} -Ionen wurden die Strom-Spannungskennlinie (vgl. 2.4.2.) und die relative Leitfähigkeit der Acetylcholin-aktivierbaren Kalium-Kanäle bei 10 μM und bei 0,1 μM Acetylcholin bestimmt (Abbildung 5). Verglichen zur Stimulation mit 0,1 μM Acetylcholin kam es bei Stimulation mit 10 μM Acetylcholin zu einer starken Zunahme der Kalium-Ströme positiv des Kalium-Gleichgewichtspotentials, was sich in einer höheren relativen Leitfähigkeit der Kalium-Kanäle widerspiegelt; negativ des Kalium-Gleichgewichtspotentials zeigte sich nur eine geringe Zunahme der Kalium-Ströme und der relativen Leitfähigkeit. Zusammengenommen legten diese Ergebnisse nahe, dass es bei starker Stimulation des Rezeptors zu einer Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung Acetylcholin-aktivierbarer Kalium-Kanäle kommt.

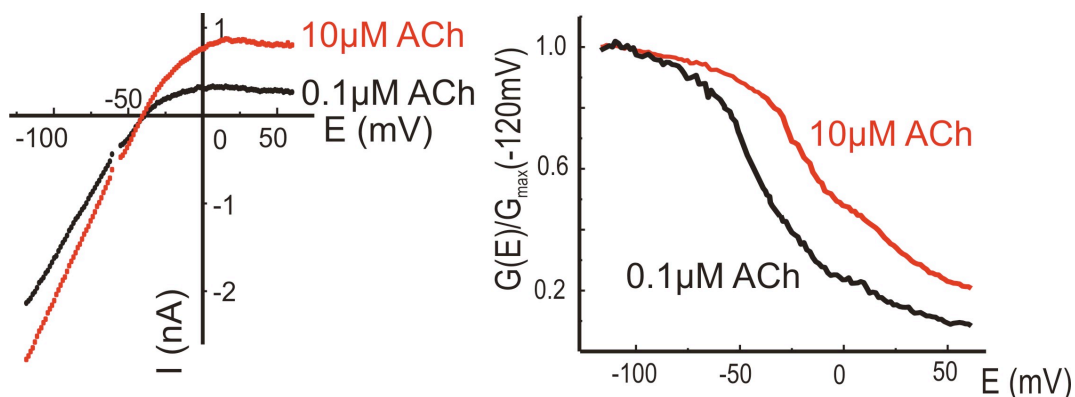


Abbildung 5: Strom-Spannungskennlinie und relative Leitfähigkeit Acetylcholin-aktivierbarer Kalium-Kanäle feiner atrialer Myozyten in Abhängigkeit von der Stimulation mit Acetylcholin

Whole-Cell-Membranströme wurden an isolierten Myozyten unter Stimulation mit 10 μM oder 0,1 μM Acetylcholin (ACh) in Abhängigkeit vom Membranpotential mittels Spannungsrampen gemessen (vgl. 2.4.2.). Die Kalium-Ströme wurden anhand der Membranströme bestimmt, die durch 1 mM Ba^{2+} geblockt werden konnten (vgl. 2.4.2.). Im linken Diagramm ist die Membranpotentialabhängigkeit der Kalium-Ströme unter Stimulation mit 10 μM bzw. mit 0,1 μM Acetylcholin dargestellt. Im rechten Diagramm ist die relative Leitfähigkeit der Kalium-Kanäle $G(E)/G_{\text{max}}(-120\text{mV})$ unter Stimulation mit 10 μM bzw. mit 0,1 μM Acetylcholin in Abhängigkeit vom Membranpotential dargestellt. Die relative Leitfähigkeit ist auf die maximale Leitfähigkeit der Acetylcholin-aktivierbaren Kalium-Kanäle bei -120 mV Membranpotential bezogen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für vier weitere untersuchte Zellen. Abbildung modifiziert nach (Hommers et al., 2003).

Acetylcholin-aktivierbare einwärtsgerichtete Kalium-Kanäle des Atriums sind typischerweise GIRK-Kanäle (Logothetis et al., 1987). Daher wurde geprüft, ob im heterologen Expressionssystem eine Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung von GIRK-Kanälen bei starker Stimulation des Rezeptors zu beobachten ist: nur bei Koexpression von G β γ -Dimeren konnte eine solche Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung gefunden werden (Hommer et al., 2003). Dies legt nahe, dass G β γ -Dimere eine wesentliche Bedeutung für die Entstehung dieses Effektes haben. Im heterologen Expressionssystem scheinen möglicherweise endogene (nicht transfizierte, sondern von der Zelle selbst exprimierte) G β γ -Dimere bei Aktivierung der Gi/o-Signalkaskade nicht in ausreichend hoher Konzentration freigesetzt zu werden, um eine Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung des GIRK-Kanals zu bewirken. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine starke Aktivierung des GIRK-Kanals durch G β γ -Dimere zu einer Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung führt.

Die Fragestellung der vorliegenden Untersuchungen gliederte sich daher in drei Teile:

- I. Der Zusammenhang zwischen Aktivierung des Kanals durch G β γ -Dimere und der Stärke der Einwärtsgleichrichtung des GIRK-Kanals sollte im heterologen Expressionssystem quantifiziert werden.
- II. Es sollte geprüft werden, ob eine Veränderung der bekannten molekularen Mechanismen der Einwärtsgleichrichtung des GIRK-Kanals der Schwächung der Einwärtsgleichrichtung zugrunde liegen können.
- III. Es sollte geprüft werden, welche Strukturen des GIRK-Kanals bei starker Aktivierung des Kanals durch G β γ -Dimere verändert werden.

2. Methoden

2.1. Verzeichnis verwendeter Lösungen und Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben stammten alle verwendeten Chemikalien von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland). Die Reinheit betrug mindestens p.A..

2.1.1. Medien für Bakterienkultur

- LB-Medium: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl in Wasser, pH 7,2
- LB-Agar: LB-Medium mit zusätzlich 10 g/l Agar
- Ampicillinhaltiges LB-Medium/LB-Agar: LB-Medium/LB-Agar mit zusätzlich 100 mg/l Ampicillin
- Tetracyclinhaltiges LB-Medium/LB-Agar: LB-Medium/LB-Agar mit zusätzlich 40 mg/l Tetracyclin

2.1.2. Medien für eukaryote Zellkultur

- Modifiziertes DMEM für HEK-293-Zellen: Dulbecco's modified Eagle-Medium mit 4,5 g/l Glucose (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) zusätzlich mit 10% (V/V) fetalem Kälberserum, 100 mg/l Streptomycin, 100000 U/l Penicillin und 2 mmol/l Glutamin versetzt
- Modifiziertes DMEM F12 für CHO-Zellen: Dulbecco's modified Eagle-Medium mit 4,5g/l Glucose, angereichert mit Nährfaktor F12 (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland), zusätzlich mit 10% (V/V) fetalem Kälberserum, 100 mg/l Streptomycin, 100000 U/l Penicillin und 2 mmol/l Glutamin versetzt
- Modifiziertes DMEM mit G418 für stabile HEK-293-Zellen: wie modifiziertes DMEM mit zusätzlich 400 mg/l G418 versetzt
- Modifiziertes DMEM zum Aliquotieren und Einfrieren von HEK-293-Zellen: 50% (V/V) modifiziertes DMEM, 40% (V/V) fetales Kälberserum, 10% (V/V) Dimethylsulfoxid

2.1.3. Puffer für Molekularbiologie

- 10x TAE-Puffer: 400 mM Tris-HCl, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 8,0
- Agarosegel: 1x TAE-Puffer mit 1% (M/V) Agarose und 0,0001% Ethidiumbromid versetzt
- 10x DNA-Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese: 100 mM EDTA, 30% (V/V) Glycerol, 0,05% (M/V) Bromphenolblau, 0,05% (M/V) Xylencyanol

2.1.4. Extrazellulärlösung für Patch-Clamp-Experimente

- Standard-Extrazellulärlösung: 120 mM NaCl, 20 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7,3, Osmolarität 330 mosmol/l; pH-Wert Abgleich mit 1 M NaOH Lösung; Osmolarität Abgleich mit 1 M NaCl Lösung
- Ba²⁺-haltige Extrazellulärlösung: Standard-Extrazellulärlösung mit zusätzlich 1 mM BaCl₂, sofern im Versuch keine andere Konzentration angegeben ist
- Cs⁺-haltige Extrazellulärlösung: Standard-Extrazellulärlösung versetzt mit CsCl entsprechend der im Versuch angegebenen Konzentration
- Noradrenalinhaltige Extrazellulärlösung: Standard-Extrazellulärlösung versetzt mit 10 µM Noradrenalin

2.1.5. Intrazellulärlösung für Patch-Clamp-Experimente

- Standard-Intrazellulärlösung: 100 mM Kalium-Aspartat, 40 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH, 5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM Natrium-ATP, 0,03 mM Natrium-GTP, pH 7,3, Osmolarität 330 mosmol/l; pH-Wert Abgleich mit 1 M KOH Lösung; Osmolarität Abgleich mit 1 M KCl Lösung
- Mg²⁺-haltige Intrazellulärlösung: 80 mM Kalium-Aspartat, 40 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH, 5 mM EGTA, 20 mM MgCl₂, 2,5 mM Natrium-ATP, 0,03 mM Natrium-GTP, pH 7,3, Osmolarität 330 mosmol/l; pH-Wert Abgleich mit 1 M KOH Lösung; Osmolarität Abgleich mit 1 M KCl Lösung

2.2. Biologisches Material und Zellkultur

2.2.1. Eukaryote Zellsysteme

- HEK-293: humane embryonale Nierenzellen (Shein et al., 1962)
- HEK-293 G8: HEK-293 Zellen, die stabil GIRK-1- und GIRK-4-Untereinheit exprimieren
- CHO: Ovarzellen des chinesischen Hamster (Tjio et al., 1958)

2.2.2. Prokaryote Zellsysteme

- *E.coli* DH5 α (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

2.2.3. Eukaryote Zellkultur

- HEK-293-Zellen wurden in mod. DMEM Medium bei 37° Celsius unter 10% CO₂ kultiviert. Zur Weiterzucht wurden die Zellen bei Konfluenz nach Ablösen mittels 0,5 ml Trypsin-EDTA (0,5 g/l) und Resuspension in Medium im Verhältnis 1:5 alle 48-72h passagiert.
- CHO-Zellen wurden in mod. DMEM F12 Medium bei 37° Celsius unter 5% CO₂ kultiviert. Zur Weiterzucht wurden die Zellen bei Konfluenz nach Ablösen mittels 0,5 ml Trypsin-EDTA (0,5 g/l) und Resuspension in Medium im Verhältnis 1:5 alle 48-72h passagiert.

2.2.4. Prokaryote Zellkultur

- *E.coli* DH5 α wurden entweder auf LB-Agarplatten oder in LB-Medium mit dem durch das transformierte Plasmid vermittelten Resistenz entsprechenden Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37°C im Brutschrank oder im Schüttelautomaten kultiviert.

2.2.5. Enzyme

- XbaI (New England Bio Labs, Frankfurt am Main, Deutschland)
- XhoI (New England Bio Labs, Frankfurt am Main, Deutschland)
- HindIII (New England Bio Labs, Frankfurt am Main, Deutschland)
- T4-Ligase (New England Bio Labs, Frankfurt am Main, Deutschland)
- Trypsin (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland), Konzentration 0,5 g/l in 0,2 g/l EDTA Lösung

2.2.6. Plasmid-DNA

- Maus-GIRK-1 (Lesage et al., 1994; Bünemann et al., 1998) in pCi-Vektor (Promega, Madison, USA)
- Maus-GIRK-4 (Lesage et al., 1994; Bünemann et al., 1998) in pCDNA1-Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Maus-GIRK-1 und Maus-GIRK-4 (Bünemann et al., 2001) in IRES-Vektor (Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Maus-GIRK-1 Δ 373 (Medina et al., 2000) in pCDNA3-Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Maus-GIRK-1 Δ 419 (Medina et al., 2000) in pCDNA3-Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- menschliches $G\beta_1$ in pCMV5-Vektor (Dr. D. Russell, University of Texas South Western Medical Center, Dallas, USA) von Dr. H.A. Bourne (Bünemann et al., 2001)
- menschliches $G\gamma_2$ in pCDNA1-Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) von Dr. H.A. Bourne (Bünemann et al., 2001)
- Maus-GIRK-141 Konstrukt (Silverman et al. 1996) in Bluescript-Vektor, umkloniert in pCDNA3-Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Maus-GIRK-414 Konstrukt (Silverman et al. 1996) in Bluescript-Vektor, umkloniert in pCDNA3-Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- menschlicher α_{2A} -Adrenorezeptor- $G\alpha_i$ -Fusionsprotein (Wise et al., 1997) in pCDNA3-Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

- CD8 (Jurman et al., 1994) im pi3-Vektor (LGC Standards, Wesel, Deutschland)

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. DNA-Transformation

Kompetente DH5 α *E. coli* Bakterien wurden mit 0,1 μ g der zu präparierenden DNA gemischt und für 10 min auf Eis, danach für 40 s bei 42° C und 120 s auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit zusätzlich 900 μ l LB-Medium versetzt und für 1h bei 37° C inkubiert. 10% (V/V) des Ansatzes wurden auf LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum überimpft.

2.3.2. DNA-Präparation

Endotoxinfreie DNA für die heterologe Expression wurde nach dem Protokoll des Endotoxinfree Maxi Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) gewonnen und aufgereinigt, wie in beschrieben. Dieses Kit lysiert Bakterien im alkalischen Milieu und reinigt die DNA chromatographisch über Anionenaustausch auf.

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm Lichtwellenlänge bestimmt. Es gilt, dass einer optischen Dichte von 1,0 bei 260 nm Lichtwellenlänge 50 ng/ μ l DNA entspricht. Die Reinheit der DNA wurde über das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm zur optischen Dichte bei 280 nm bestimmt. Ein Verhältnis größer als 1,8 wurde als ausreichend angesehen.

2.3.3. DNA-Aufreinigung

DNA-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese mit 1% (M/V) Agarosegelen der Größe nach getrennt. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids in DNA-Fragmente, sind diese bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 365 nm fluoreszierend sichtbar. Banden erwarteter Größe wurden ausgeschnitten und mittels Qiagen QIAEX II Kit nach dem Protokoll des Herstellers, oder mittels dem Qiagen QIAquick Spin Purification Kit nach dem Protokoll des Hersteller aufgereinigt.

2.3.4. Subklonierung von GIRK-141- und GIRK-414-Konstrukt von Bluescript-Vektor in pCDNA3-Vektor

Von Dr. H.A. Lester zur Verfügung gestelltes Maus-GIRK-141 Fusions-Konstrukt im Bluescript-Vektor und Maus-GIRK-414 Fusions-Konstrukt im Bluescript-Vektor (Silverman et al., 1996) wurden aus dem Bluescript-Vektor in den pCDNA3-Vektor über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme XbaI und XhoI subkloniert. Die Konstrukte wurden mit den Restriktionsenzymen XbaI und XhoI in einem Schnittreaktionsansatz entsprechend dem Protokoll des Herstellers New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) aufgeschnitten. Die Insert-DNA wurde durch Auftrennung der DNA des Schnittreaktionsansatzes nach DNA-Fragmentgröße aufgereinigt, wie unter 2.3.3. beschrieben. Die Ligierung erfolgte mittels T4-Ligase. Der Reaktionsansatz wurde nach dem Protokoll des Herstellers angesetzt und unter verschiedenen Inkubationsbedingungen inkubiert. Nach Inkubation wurde der Ansatz, wie in 2.3.1. beschrieben, transformiert und, wie in 2.2.4. beschrieben, auf LB-Agar kultiviert. Im Falle von Bakterienkolonien wurden diese, wie in 2.2.4. beschrieben, in LB-Medium kultiviert. Zur Überprüfung des Ligationsproduktes wurde nach einem abgekürzten Protokoll (keine Aufreinigung über Säulen) des Maxi Prep Kits von Qiagen (Hilden, Deutschland) DNA gewonnen und zum einen per Restriktionsenzymverdau auf die richtige Länge der geschnittenen DNA-Fragmente und zum anderen bei positivem Ergebnis mittels eines Patch-Clamp-Experimentes auf Expression funktionsfähiger GIRK-Kanäle in HEK-293-Zellen geprüft.

2.3.5. DNA-Transfektion

Endotoxinfreie DNA wurde mit dem Effectene Transfection Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) in HEK-293-Zellen dem Protokoll des Herstellers entsprechend transfiziert. Sowohl die verwendete DNA als auch die verwendete Menge sind jeweils im entsprechenden Versuch angegeben. Für jeden Versuch wurde die optimale Menge an Effectene-Reagenz bzgl. Transfektionseffizienz und Zellsterben individuell bestimmt. Transfizierte Zellen wurden max. 18h vor den Experimenten auf 3cm-

Zellkulturschalen im Verhältnis 1:20 bis 1:50 passagiert, um für die Experimente einzelne Zellen vorliegen zu haben. Die Experimente wurden 40-48 h nach der Transfektion durchgeführt.

Für Patch-Clamp-Experimente wurde als Transfektions-Reportersystem die Koexpression von CD8-Antigen verwendet. Als Richtwert für die DNA-Menge an Reporter gen im Transfektions-Ansatz wurde dabei 10% der transfizierten DNA-Menge genommen. Transfizierte Zellen konnten so durch die Bindung von Dynabeads-Kugeln (DynaL Biotech, Hamburg, Deutschland), die mit anti-CD8-Antikörpern beschichtet waren, sichtbar gemacht werden (Vartdal et al., 1986).

2.3.6. Etablierung einer HEK-293-Zelllinie, die GIRK-1 und GIRK-4 stabil exprimiert

Es wurde eine klonale HEK-293-Zelllinie etabliert, die GIRK-1- und GIRK-4-Untereinheiten stabil exprimiert. Nach einer Transfektion, wie methodisch in 2.3.5. beschrieben, mit GIRK-1/4-DNA im IRES-Vektor wurden die Zellen in G418-haltigem, modifiziertem DMEM selektioniert. Sobald transient transfizierte Zellen gestorben waren, wurden die überlebenden Zellen als einzelne Klone getrennt, weiter passagiert und mittels Patch-Clamp-Experimenten auf die Expression von GIRK-Kanälen untersucht.

2.4. Elektrophysiologische Methoden

2.4.1. Prinzip der Patch-Clamp-Methodik

Ziel der Patch-Clamp-Methodik ist es, Ionenströme durch eine Zellmembran über einen geschlossenen Stromkreis zwischen Intrazellulärraum und Extrazellulärraum zu messen. Eine Elektrode liegt im Extrazellulärraum (Badelektrode). Eine zweite Elektrode liegt in einer dünn ausgezogenen Glaspipette, die mit einer Lösung gefüllt ist, die dem Intrazellulärraum nachempfunden ist. Diese Glaspipette wird auf die Zellmembran gebracht. Durch Unterdruck wird die Zellmembran an die Pipettenspitze „angesaugt“ bis ein Widerstand von mehreren G Ω (Giga-Seal genannt) zwischen Badelektrode und

Elektrode in der Glaspipette besteht. Liegt die Pipette im Giga-Seal auf der Zellmembran an, kann durch einen weiteren Unterdruckimpuls die Zellmembran unter der Pipette geöffnet werden. Dadurch ist die Pipette mit dem Intrazellulärraum verbunden. Der Widerstand des nun bestehenden Stromkreises wird (bei intaktem Giga-Seal) durch die Offenwahrscheinlichkeit der Ionenkanäle der Zellmembran unter der untersuchten Versuchsbedingung bestimmt. Jede Änderung dieses Widerstands in Abhängigkeit von definierbaren Faktoren kann als Änderung des Stroms bei einem vorgegebenen Membranpotential gemessen werden. Diese Konfiguration der Patch-Clamp-Methodik wird Whole-Cell-Konfiguration genannt. Der Messverstärker des Patch-Clamp-Setups zeichnet sich durch eine elektrische Schaltung aus, die es ermöglicht eine konstante Spannung an der Zellmembran zu erhalten und den fließenden Strom mit hoher zeitlicher Auflösung verzögerungsfrei zu messen, weshalb man auch von Voltage-Clamp spricht (Klinke et al., 1996; Hille et al., 2001; Schmidt et al., 2007).

2.4.2. Durchführung

Die folgenden Versuche wurden in der Voltage-Clamp-Whole-Cell-Konfiguration durchgeführt. Der Gesamtionenstrom durch eine Zellmembran (auch Membranstrom genannt) wird mittels dieser Methode in Abhängigkeit vom Membranpotential gemessen (Hamill et al., 1981). In der extrazellulären (auch Badlösung genannten) Ionenlösung, die in ihrer Zusammensetzung dem physiologischen Extrazellulärraum nachempfunden ist, wurde die Kaliumkonzentration auf 20 mM erhöht, wodurch sich das Kalium-Gleichgewichtspotential bei -50 mV einstellt.

Die untersuchten Zellen konnten über eine Superfusionsvorrichtung spezifisch und reversibel von extrazellulär mit verschiedenen Agonist-, Ba^{2+} - und Cs^{+} -Konzentrationen superfundiert werden, was Messungen unter verschiedenen Versuchsbedingungen an der gleichen Zelle ermöglicht.

Die Abhängigkeit des GIRK-Kanal-Stroms vom Membranpotential (Strom-Spannungskennlinie des GIRK-Kanal-Stroms) wurde über ein kontinuierlich ansteigendes Membranpotential (Spannungsrampe genannt) von -120 mV bis +60 mV in einer Sekunde bestimmt. Da die Einwärtsgleichrichtung von GIRK-Kanälen wesentlich durch

den membranpotentialabhängigen, langsamen Kanalblock intrazellulärer Polyamine vermittelt wird, wäre es denkbar gewesen, dass die langsame Kinetik dieses Blocks das Messergebnis einer Strom-Spannungskennlinie verzerrt. Es zeigte sich aber, dass langsame Spannungsrampen Strom-Spannungskennlinien ergaben, die deckungsgleich zu denen waren, die mit schnellen Spannungsrampen (innerhalb einer Sekunde) bestimmt worden waren. Der zeitliche Abstand zwischen zwei Spannungsrampen betrug 10 Sekunden.

GIRK-Kanal-Ströme und Ströme anderer einwärtsgerichteter Kalium-Kanäle lassen sich durch den Kanal-Block mit Ba^{2+} identifizieren. In den vorliegenden Untersuchungen wurde nur im heterologen Expressionssystem gearbeitet: GIRK-Kanäle waren die einzig exprimierten Kalium-Kanäle. Der GIRK-Kanal-Strom wurde als Differenz des Membranstroms ohne und in Gegenwart von 1 mM Ba^{2+} bestimmt. Der durch Ba^{2+} -Ionen blockierte Strom entspricht dem GIRK-Kanal-Strom. Der Begriff „GIRK-Kanal-Strom“ wird synonym zu „durch Ba^{2+} -Ionen blockierter Membranstrom“ verwendet.

Die Pipetten wurden aus Borosilikat Glas-Kapillaren mit einem Pipetten-Automaten (Sutter Instrument Comp., Novato, USA; Modell p97) so hergestellt, dass ihr DC-Widerstand zwischen 3-6M Ω lag. Membranströme wurden mit einem EPC-9-Patch-Clamp-Verstärker von HEKA Instruments (New York, USA) mit dem Programm Pulse (ebenfalls von HEKA) unter Verwendung eines analogen 3kHz-Bessel-Filters aufgezeichnet (Bünemann et al., 1998).

2.5. Software

Die Daten von Patch-Clamp Experimenten wurden mittels Pulse von HEKA Instruments aufgezeichnet und ausgewertet. Die Datenanalyse und statistische Auswertung wurde mit Student's t-Test in Origin 6.5 (OriginLab, Northampton, USA) vorgenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Das Verhältnis der Expression von G β γ -Dimer zu GIRK-Kanal beeinflusst die mittlere Stärke der Einwärtsgleichrichtung

In der Literatur war zum Zeitpunkt der Untersuchungen eine Regulierung der Einwärtsgleichrichtung von GIRK-Kanälen durch G β γ -Dimere nicht beschrieben. Gemäß den in 1.5. geschilderten Überlegungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Zusammenhang zwischen Stärke der Einwärtsgleichrichtung und dem Verhältnis der Expression von G β γ -Dimer zu GIRK-Kanal besteht.

Zur Quantifizierung der Einwärtsgleichrichtung wurde ein Einwärtsgleichrichtungsquotient F_{ir} eingeführt. Dieser wurde als das Verhältnis des GIRK-Kanal-Stroms 50 mV positiv des Kalium-Gleichgewichtspotentials zu dem 50 mV negativ des Kalium-Gleichgewichtspotentials definiert ($F_{ir} = I(E_{rev} + 50 \text{ mV})/I(E_{rev} - 50 \text{ mV})$; E_{rev} : Kalium-Gleichgewichtspotential). Einem hohen F_{ir} entspricht demnach eine schwache Einwärtsgleichrichtung.

In den Untersuchungen sollte der mittlere F_{ir} unter verschiedenen Transfektionsbedingungen, die zu verschiedenen Verhältnissen der Expression von G β γ -Dimer zu GIRK-Kanal führen, bestimmt werden. Angenommen wurde hierbei, dass die Expression eines Proteins in einer Zelle im Mittel mit der transfizierten Menge seiner DNA korreliert.

Die Expression des GIRK-Kanals lässt sich in einer einzelnen Zelle über die Stromdichte (GIRK-Kanal-Strom bei -90 mV in pA dividiert durch die Membrankapazität in pF) quantifizieren. Die Expression des G β γ -Dimers jedoch lässt sich in einer einzelnen Zelle nicht quantifizieren. Daher wurde in den Untersuchungen die Menge der transfizierten DNA für G β γ -Dimer konstant gehalten und nur die Menge der transfizierten DNA für GIRK-Kanal variiert, da sich die Expression des GIRK-Kanals wie oben beschrieben experimentell bestimmen lässt.

Es wurde erwartet, dass der mittlere F_{ir} bei der Transfektionsbedingung am größten ist, bei der das Verhältnis von transfizierter DNA für G β γ -Dimer zu DNA für GIRK-Kanal am größten ist. Unter dieser Bedingung müsste pro GIRK-Kanal am meisten G β γ -

Dimer exprimiert werden und die mittlere GIRK-Kanal-Stromdichte müsste von allen untersuchten Versuchsbedingungen am geringsten sein.

Tabelle 2 zeigt die verschiedenen Transfektionsbedingungen, unter denen HEK-293-Zellen transfiziert wurden. Um die DNA-Menge des gesamten Transfektionsansatzes konstant zu halten, wurden zusätzlich verschiedene Mengen leeren pCDNA3-Vektors kotransfiziert.

Tabelle 2: Transfektionsbedingungen des Versuchs, angegeben sind DNA Mengen in μg pro Transfektion auf eine 6 cm Schale 60% konfluenter HEK-293-Zellen

DNA	Bedingung 1	Bedingung 2	Bedingung 3	Kontrolle
GIRK-1/4 im IRES-Vektor	0,1	0,4	0,75	0,75
G β ₁ und G γ ₂	Je 0,5	Je 0,5	Je 0,5	-
α _{2A} -AR-G α _{i1} -Fusionsprotein	0,5	0,5	0,5	0,5
CD8	0,05	0,05	0,05	0,05
pCDNA3	1,3	0,7	0	1,5

Durch Superfusion der Zelle mit 10 μM Noradrenalin wurden adrenerge α _{2A}-Rezeptoren stimuliert, was zu einer Aktivierung des GIRK-Kanals führte. Um die GIRK-Kanal-Stromdichte und den F_{ir} berechnen zu können, wurde die Stärke des GIRK-Kanal-Stroms in Abhängigkeit vom Membranpotential mittels Spannungsrampen bestimmt (wie in 2.4.2. beschrieben).

Wie Abbildung 6 zeigt, bestätigte das Ergebnis des Versuchs die Erwartungen. Die mittlere GIRK-Kanal-Stromdichte bei -90 mV Membranpotential wurde mit steigender Menge an transfizierter DNA für GIRK-Kanal größer und war bei Bedingung 3 am größten. Der Einwärtsgleichrichtungsquotient war für Bedingung 1 mit größtem Verhältnis von transfizierter DNA für G $\beta\gamma$ -Dimer zu DNA für GIRK-Kanal am größten; die Einwärtsgleichrichtung des GIRK-Kanals war unter dieser Bedingung am schwächsten.

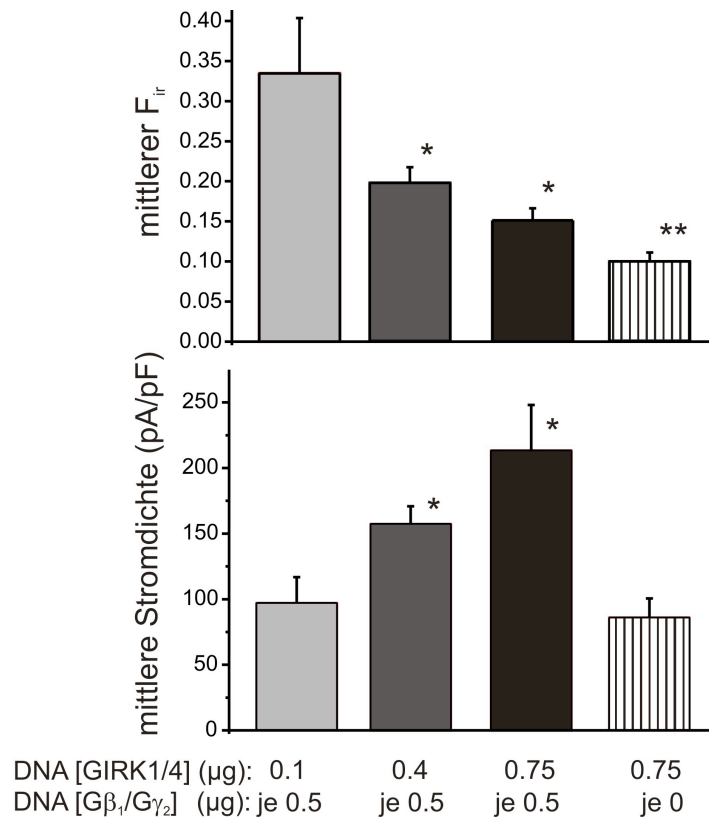


Abbildung 6: Stärke der Einwärtsgleichrichtung und mittlere Stromdichte von GIRK-Kanälen in Abhängigkeit von der Menge transfizierter DNA für GIRK-Kanal bei konstanter Menge an transfizierter DNA für Gβγ-Dimer

HEK-293-Zellen wurden bei konstanter Menge von cDNA für Gβ₁, Gγ₂, α_{2A}-AR-Gα_{i1}-Fusionsprotein und CD8 transient mit den angegebenen Mengen cDNA für GIRK-1/4 im IRES-Vektor transfiziert. 40 h bis 48 h nach der Transfektion wurden Strom-Spannungskennlinien von GIRK-Kanal-Strömen bei Stimulation des α_{2A}-Rezeptors mit 10 µM Noradrenalin (maximale GIRK-Kanal-Aktivierung) bestimmt. Das obere Diagramm zeigt die Stärke der Einwärtsgleichrichtung anhand der Mittelwerte der Einwärtsgleichrichtungsquotienten ($F_{ir} = I(E_{rev} + 50 \text{ mV})/I(E_{rev} - 50 \text{ mV})$) unter den entsprechenden Transfektionsbedingungen. Die korrespondierende mittlere GIRK-Kanal-Stromdichte (bei -90 mV Membranpotential bestimmt) ist im unteren Diagramm dargestellt. Signifikante Unterschiede im Mittelwert der Messwerte zur ersten Transfektionsbedingung (0.1 µg cDNA für GIRK-1/4 im IRES-Vektor; je 0.5 µg cDNA für Gβ₁ und Gγ₂) sind entsprechend bezeichnet (* p < 0.05; ** p < 0.01; n=5-9).

Für die folgenden Experimente wird die Aktivierung von GIRK-Kanälen durch Rezeptor-Stimulation bei maximaler Koexpression von Gβγ-Dimeren als „schwach einwärtsgleichrichtende Bedingungen“ bezeichnet, während die Aktivierung von GIRK-Kanälen nur durch Rezeptor-Stimulation ohne Koexpression von Gβγ-Dimeren als „stark einwärtsgleichrichtende Bedingungen“ bezeichnet wird.

3.2. Stöchiometrisches Verhältnis von G β γ -Dimeren zu GIRK-Kanälen bei schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen

Um die Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung des GIRK-Kanals durch G β γ -Dimere näher zu charakterisieren, wurde angestrebt, die Interaktion zwischen G β γ -Dimeren und GIRK-Kanälen unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen stöchiometrisch zu quantifizieren. In der Literatur wurde beschrieben, dass bis zu vier G β γ -Dimere gleichzeitig an einen GIRK-Kanal binden können (Corey et al., 2001; siehe auch 1.4.4. und 1.4.5.). Ein Einfluss von G β γ -Dimeren auf die Einwärtsgleichrichtung des GIRK-Kanals war bisher nicht untersucht oder beschrieben worden.

Es sollte die Hypothese geprüft werden, dass bei Aktivierung des GIRK-Kanals durch die Bindung von vier G β γ -Dimeren die Einwärtsgleichrichtung abgeschwächt wird, während die Bindung von drei G β γ -Dimeren die Einwärtsgleichrichtung nicht abschwächt. GIRK-Kanäle können im heterologen Transfektionssystem durch Transfektion von Kettenkonstrukten aus GIRK-Kanal-Untereinheiten exprimiert werden (Silverman et al., 1996). In diesen Konstrukten sind GIRK-1-, GIRK-4- und GIRK-1-Untereinheiten bzw. GIRK-4-, GIRK-1- und GIRK-4-Untereinheiten über ihre N- und C-Termini fusioniert. Zusammen mit der komplementären, vierten GIRK-Kanal-Untereinheit transfiziert, werden GIRK-Kanäle mit vier Bindungsstellen für G β γ -Dimere exprimiert (Kontrollbedingung). Um GIRK-Kanäle mit nur drei Bindungsstellen für G β γ -Dimere zu exprimieren (Versuchsbedingung), wurden die GIRK-Kanal-Kettenkonstrukte zusammen mit einer mutierten GIRK-Kanal-Untereinheit, die keine G β γ -Dimere binden kann, transfiziert (Medina et al., 2000).

Um unter Kontroll- und Versuchsbedingung schwach einwärtsgerichtende Bedingungen zu haben, sollten unter Kontroll- und Versuchsbedingung G β γ -Dimere maximal möglich koexprimiert werden. Wenn unter Kontrollbedingungen GIRK-Kanäle schwach einwärtsgerichtend und unter Versuchsbedingungen stark einwärtsgerichtend wären, spräche dies für die Hypothese, dass die Einwärtsgleichrichtung des GIRK-Kanals bei Bindung von vier G β γ -Dimeren abgeschwächt wird.

Es stellt ein Problem für die Versuchsauswertung dar, dass auch unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen aufgrund einer mangelnden Expression von G β γ -Dimeren in einigen Zellen stark einwärtsgleichrichtende GIRK-Kanäle gefunden werden können. Würde diese Situation unter Versuchsbedingungen mit drei Bindungsstellen für G β γ -Dimere zu häufig auftreten, wäre eine sinnvolle Versuchsauswertung nicht möglich, da die Hypothese dann fälschlicherweise als richtig angenommen würde. Die Wahrscheinlichkeit für diesen Fall sollte daher geringer als 5% sein. Gemäß folgender Gleichung lässt sich berechnen, wie häufig dann stark einwärtsgleichrichtende GIRK-Kanäle unter Versuchsbedingungen maximal vorkommen dürfen, wenn zufällig 10 transfizierte Zellen untersucht werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle schwach einwärtsgleichrichtende GIRK-Kanäle zeigt, sei p:

$$0,05 > (1 - p)^{10}$$

$$p < 1 - \sqrt[10]{0,05}$$

$$p < 0,259$$

Das bedeutet, wenn unter Versuchsbedingungen weniger als 25,9% der transfizierten Zellen schwach einwärtsgleichrichtende GIRK-Kanäle zeigen, dass bei 10 untersuchten Zellen mit mehr als 5% Wahrscheinlichkeit nur stark einwärtsgleichrichtende GIRK-Kanäle gefunden werden können. Dann würde die Hypothese des Versuchs fälschlich als richtig angenommen werden.

In Vorversuchen konnte aber diese Häufigkeit nicht unter Kontrollbedingungen mit dem verwendeten Effectene-Transfektions-System erreicht werden. Alternative Transfektionsmethoden (mittels Adenovirus und mittels Calciumphosphat) zeigten das gleiche Problem. Da im Rahmen der Untersuchungen aus zeitlichen Gründen keine Umklonierung der GIRK-Kanal-Kettenkonstrukte in einen schwach exprimierenden Vektor vorgenommen werden konnte, lässt sich nicht ausschließen, dass eine starke Expression der GIRK-Kanal-Kettenkonstrukte im pCDNA3-Vektor die Ursache dieses Problems war. Dieser Versuch wurde daher abgebrochen.

3.3. Polyamine und Mg²⁺-Ionen blockieren den GIRK-Kanal unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen nicht mit reduzierter Affinität

Physiologisch ist der membranpotentialabhängige Block von GIRK-Kanälen durch intrazelluläre Polyamine und intrazelluläre Mg²⁺-Ionen einer der wesentlichen Mechanismen der Einwärtsrichtung von GIRK-Kanälen (siehe 1.4.3.). Die folgenden Versuche sollten prüfen, ob diese beiden Mechanismen in die Abschwächung der Einwärtsrichtung von GIRK-Kanälen involviert sind.

Bei Membranpotentialen positiv vom Kalium-Gleichgewichtspotential binden Polyamine an den GIRK-Kanal und blockieren diesen. Die in 1.5. und in 3.1. beschriebenen Ergebnisse könnten daher durch eine reduzierte Affinität, mit der Polyamine unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen an den GIRK-Kanal binden, erklärt werden. Die Kinetik, mit der sich der GIRK-Kanal-Strom bei einer sprunghaften Veränderung des Membranpotentials von negativ zu positiv des Kalium-Gleichgewichtspotentials verringert, spiegelt die Bindung von Polyaminen an den GIRK-Kanal wider (Yamada et al., 1998). Bei einem Sprung von -120 mV zu +60 mV Membranpotential wäre bei einer verringerten Bindungsaffinität von Polyaminen eine langsamere Blockierung des GIRK-Kanals und somit ein langsamerer Rückgang des GIRK-Kanal-Stroms zu erwarten. Mittels dieser Methodik sollte die erste Hypothese überprüft werden, dass unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen die Affinität reduziert ist, mit der Polyamine an den GIRK-Kanal binden und ihn blockieren.

Für stark einwärtsgerichtende Bedingungen wurde eine erste 6 cm Schale HEK-293-Zellen, die GIRK-1 und GIRK-4 stabil exprimieren, mit 0,7 µg α_{2A}-AR-Gα_{i1}-Fusionsprotein und 0,2 µg CD8 transfiziert. Für schwach einwärtsgerichtende Bedingungen wurde eine weitere 6 cm Schale der gleichen Zelllinie mit 0,7 µg α_{2A}-AR-Gα_{i1}-Fusionsprotein und 0,2 µg CD8 und zusätzlich mit je 1,4 µg DNA von Gβ₁ und Gγ₂ transfiziert.

Abbildung 7 zeigt repräsentativ die Ergebnisse von je einer untersuchten Zelle unter schwach (rot) und unter stark (schwarz) einwärtsgerichtenden Bedingungen. GIRK-Kanal-Ströme sind ab dem Sprung von -120 mV zu +60 mV Membranpotential dargestellt. Wie zu erwarten, war der GIRK-Kanal-Strom in Auswärtsrichtung bei

+60 mV Membranpotential unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen größer, wenn die GIRK-Kanal-Ströme unter beiden Bedingungen auf ihren maximalen Strom bei -120 mV normiert wurden. Nach Normierung auf den maximalen GIRK-Kanal-Strom bei +60 mV wird sichtbar, dass es in der Kinetik, mit der sich der GIRK-Kanal-Strom nach dem Sprung auf +60 mV verringert, keinen Unterschied zwischen stark und schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen gibt (linke untere Abbildung). Normiert auf den maximalen GIRK-Kanal-Strom bei -120 mV zeigt die Kinetik des GIRK-Kanal-Stroms beim folgenden Membranpotentialsprung auf -120 mV ebenfalls keinen Unterschied zwischen stark und schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen (rechte untere Abbildung).

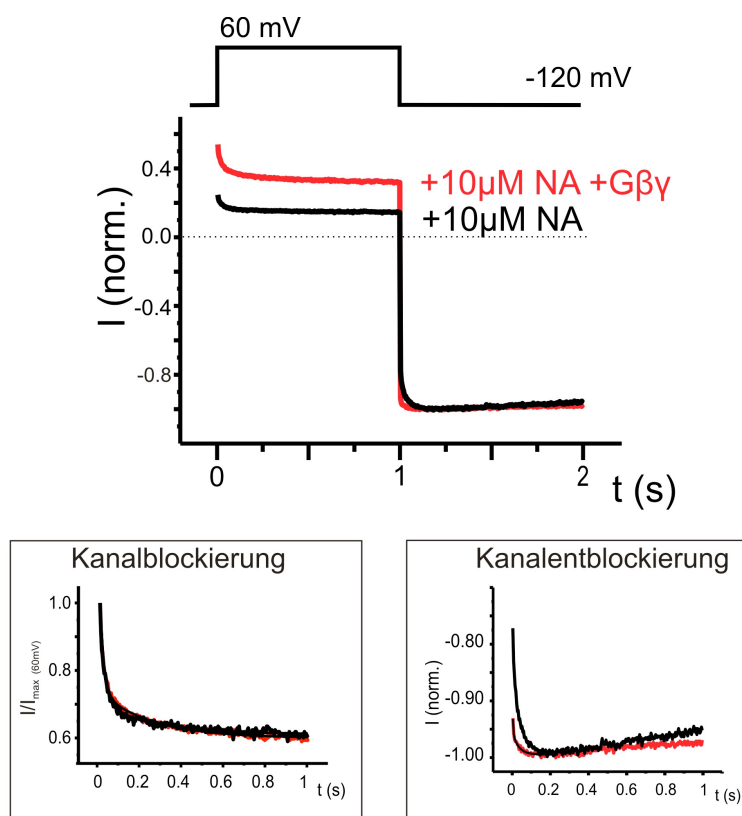


Abbildung 7: Kinetik des GIRK-Kanal-Stroms nach Membranpotentialsprüngen

Die Kinetik des GIRK-Kanal-Stroms nach Membranpotentialsprüngen war unter schwach und unter stark einwärtsgerichtenden Bedingungen nicht signifikant verschieden. Die Abbildung zeigt GIRK-Kanal-Ströme bei Stimulation des α_{2A} -Rezeptors mit $10\mu\text{M}$ Noradrenalin (NA) nach Membranpotentialsprüngen (von -120 mV auf +60 mV und wieder auf -120 mV) von je einer Zelle unter schwach (rot) und unter stark (schwarz) einwärtsgerichtenden Bedingungen. Die Ströme wurden in der linken unteren Abbildung für beide Bedingungen auf den maximalen Auswärtsstrom und in der rechten unteren Abbildung auf den maximalen Einwärtsstrom normalisiert.

Mittels einer Biexponentialfunktion für Zerfallsreaktionen erster Ordnung lässt sich die gemessene Kinetik des GIRK-Kanal-Stroms bei Membranpotentialsprung von -120 mV auf +60 mV (GIRK-Kanal-Blockierung) und bei Membranpotentialsprung von +60 mV auf -120 mV (GIRK-Kanal-Entblockierung) mathematisch nähern. Diese Funktion ist in Formel 1 dargestellt.

Formel 1: Biexponentialfunktion zur Näherung der Kinetik des GIRK-Kanal-Stroms bei Membranpotentialsprüngen

$$y = y_{\infty} + a \cdot e^{-\frac{x}{k_1}} + b \cdot e^{-\frac{x}{k_2}}$$

Der Parameter y_{∞} beschreibt die Asymptote des GIRK-Kanal-Stroms zum Zeitpunkt $x=\infty$. Jeder Exponential-Term stellt im eigentlichen Sinn eine eigenständige Zerfallsreaktion erster Ordnung dar. a bezeichnet den Anteil der ersten Reaktion, k_1 die Zeitkonstante der ersten Reaktion, b den Anteil der zweiten Reaktion, k_2 die Zeitkonstante der zweiten Reaktion und x die Zeit.

Die Mittelwerte der Zeitkonstanten dieser Näherung waren sowohl für GIRK-Kanal-Blockierung als auch für GIRK-Kanal-Entblockierung unter stark und schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen nicht statistisch signifikant verschieden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Kinetische Daten des GIRK-Kanal-Blocks bei Membranpotentialsprüngen unter schwach und unter stark einwärtsgerichtenden Bedingungen

Zeitkonstante	Schwach einwärtsgerichtende Bedingung (n=7) (Mittelwert ± SEM in ms)	Stark einwärtsgerichtende Bedingung (n=5) (Mittelwert ± SEM in ms)
k_1 Entblockierung	1,05 ± 0,46	1,28 ± 0,10
k_2 Entblockierung	9,10 ± 2,80	10,00 ± 0,95
k_1 Blockierung	2,75 ± 0,62	4,90 ± 0,97
k_2 Blockierung	36,00 ± 9,30	58,80 ± 16,00

Die zweite Hypothese war, dass die Einwärtsgleichrichtung des GIRK-Kanals unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen abgeschwächt ist, weil intrazelluläre Mg^{2+} -Ionen den GIRK-Kanal mit niedrigerer Affinität blockieren. In diesem Fall könnte eine Erhöhung der intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration der Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung entgegen wirken. Wenn die Konzentration von Mg^{2+} -Ionen in

der Patch-Pipette auf 20 mM (normal: 1 mM) erhöht wurde, blieben GIRK-Kanal-Ströme dennoch schwach einwärtsgerichtet.

Beide Hypothesen wurden durch die Versuche daher nicht bestätigt.

3.4. Extrazelluläre Ba^{2+} -Ionen blockieren GIRK-Kanäle unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen mit reduzierter Affinität

Wie bereits in 3.2. erläutert, wurde vermutet, dass eine Bindung von vier $G\beta\gamma$ -Dimeren an den GIRK-Kanal Voraussetzung für eine Strukturveränderung ist, die die Abschwächung der Einwärtsgerichtung des GIRK-Kanals ermöglicht. Es sollte untersucht werden, an welchen Bereichen der Struktur des GIRK-Kanals es zu einer Konformationsänderung unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen kommt. Naheliegender wäre, dass sich diese Bereiche dort befinden, wo sich alle vier Untereinheiten räumlich sehr nahe stehen (z.B. am oder in der Nähe des Selektivitätsfilters (vgl. Abbildung 2)). Diese Vermutung wird gestützt durch experimentell identifizierte Aminosäurereste nahe des Selektivitätsfilters, die die Stärke der Einwärtsgerichtung bei physiologisch stark oder physiologisch schwach einwärtsgerichtenden Kalium-Kanälen bestimmen (Nichols et al., 1997; Lancaster et al., 2000). In den weiteren Versuchen vorliegender Untersuchungen sollte nach Hinweisen für die Hypothese gesucht werden, dass die Abschwächung der Einwärtsgerichtung von GIRK-Kanälen mit einer Veränderung der Konformation von Strukturen nahe des Selektivitätsfilters unabhängig vom Membranpotential einhergeht.

Kristallstudien an einem Komplex aus KcsA-Kanal (der zum Zeitpunkt der Untersuchung als Struktur-Modell für den GIRK-Kanal verwendet wurde) und Ba^{2+} -Ionen, welche einwärtsgerichtende Kalium-Kanäle von extrazellulärer Seite her blockieren können (vgl. 1.4.2.), hatten Ba^{2+} -Bindungsstellen in unmittelbarer Nähe zur cytosolischen Seite des Selektivitätsfilters gefunden (Doyle et al., 1998; Jiang et al., 2000). Nahe dieser Ba^{2+} -Bindungsstellen waren Aminosäurereste identifiziert worden, die für die stark einwärtsgerichtenden Eigenschaften der Kcs-Kanäle relevant sind (Nichols et al., 1997; Lancaster et al., 2000). Würden Ba^{2+} -Ionen den GIRK-Kanal unter

schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen mit geringerer Affinität blockieren als unter stark einwärtsgerichtenden Bedingungen, könnte dies mit einer Veränderung der Konformation von Strukturen nahe des Selektivitätsfilters unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen in Zusammenhang stehen.

Im Versuch wurden Zellen wie in 3.3. transfiziert und eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve für den GIRK-Kanal-Block durch Ba^{2+} -Ionen bei -90 mV Membranpotential unter stark und unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen bestimmt. Dazu wurde der Membranstrom in der Whole-Cell-Konfiguration bei -90 mV Membranpotential ohne bzw. in Gegenwart von $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $40 \mu\text{M}$, $140 \mu\text{M}$, 1 mM und 2 mM Ba^{2+} bestimmt. Zur Normierung der Daten wurde der durch 2 mM Ba^{2+} -Ionen geblockte Membranstrom als maximal geblockter GIRK-Kanal-Strom definiert (vgl. 2.4.2.).

In Abbildung 8 ist die resultierende Konzentrations-Wirkungs-Kurve unter stark (schwarz) und unter schwach (rot) einwärtsgerichtenden Bedingungen dargestellt.

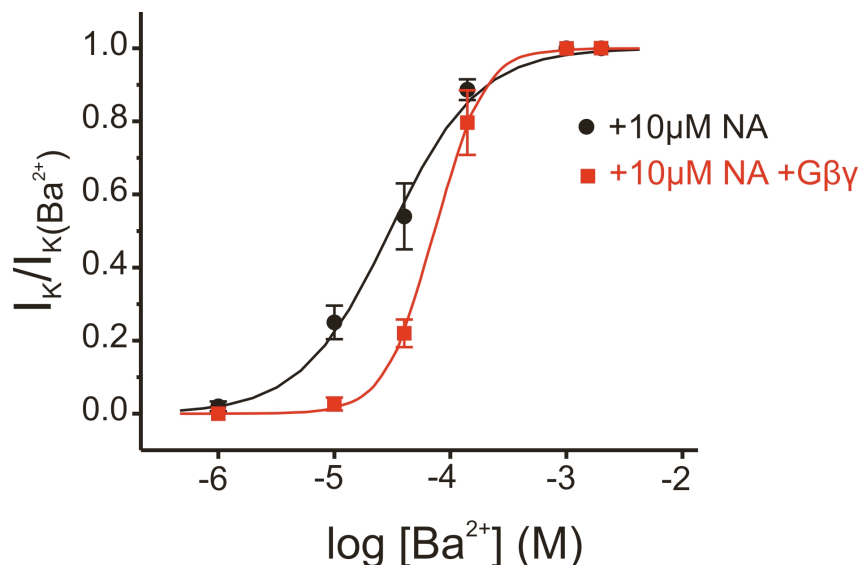


Abbildung 8: Konzentrations-Wirkungs-Kurve des GIRK-Kanal-Blocks durch Ba^{2+} -Ionen unter stark und unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen

GIRK-Kanäle wurden unter stark (schwarz) und schwach (rot) einwärtsgerichtenden Bedingungen durch $10 \mu\text{M}$ Noradrenalin (NA) maximal aktiviert. Das Ausmaß des GIRK-Kanal-Blocks durch Ba^{2+} -Ionen wurde bei einem Membranpotential von -90 mV als Verhältnis des geblockten Membranstroms in Gegenwart von der angegebenen Konzentration Ba^{2+} ($I_{\text{GIRK}(\text{Ba}^{2+})}$) zum maximal geblockten Membranstrom bei 2 mM Ba^{2+} (I_{GIRK}) bestimmt. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve wurde mit Hilfe der Software Origin 6.1 als Konzentrations-Wirkungs-Kurve gemäß Formel 2 genähert ($n=3$ (schwach einwärtsgleichrichtend) und $n=5$ (stark einwärtsgleichrichtend)).

Das Ausmaß des GIRK-Kanal-Blocks zeigte sowohl in Gegenwart von 1mM als auch von 2 mM Ba²⁺ zwischen stark und schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen keinen statistisch signifikanten Unterschied. In Gegenwart von 10 µM und 40 µM Ba²⁺ wurden unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen signifikant weniger GIRK-Kanäle geblockt.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven in Abbildung 8 wurden mathematisch mittels Formel 2 genähert. Unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen beträgt der Parameter EC₅₀ 73 µM bei einem Hill-Koeffizienten von 2,0. Unter stark einwärtsgerichtenden Bedingungen beträgt der EC₅₀ 20 µM bei einem Hill-Koeffizienten von 1,1. Demnach blockieren Ba²⁺-Ionen den GIRK-Kanal unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen mit verringerter Affinität.

Formel 2: Konzentrations-Wirkungs-Kurve

$$\frac{\Delta y}{y_0} = 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^h}$$

Der Parameter h steht für den Hill-Koeffizienten, EC₅₀ für den Wert der halbmaximalen Wirkung, x ist die Konzentration und $\Delta y/y_0$ beschreibt das relative Ausmaß der Wirkung in Abhängigkeit der Konzentration x.

Aufgrund der Nähe der Bindungsstellen für Ba²⁺-Ionen zum Selektivitätsfilter könnte das Versuchsergebnis ein Hinweis darauf sein, dass unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen die Konformation von Strukturen nahe des Selektivitätsfilters verändert ist.

3.5. Cs⁺-Ionen blockieren GIRK-Kanäle unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen mit reduzierter Affinität

Neben Ba²⁺ ist auch Cs⁺ ein Ion, das einwärtsgerichtende Kalium-Kanäle in der Nähe des Selektivitätsfilters von extrazellulärer Seite her blockieren kann (Thompson et al., 2000). Würden Cs⁺-Ionen analog Ba²⁺-Ionen den GIRK-Kanal unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen mit einer geringeren Affinität blockieren, würde dies die Hypothese unterstützen, dass der Abschwächung der Einwärtsrichtung

von GIRK-Kanälen eine Veränderung der Konformation von Strukturen nahe des Selektivitätsfilters zugrunde liegt.

Die Affinität, mit der Cs^+ -Ionen GIRK-Kanäle blockieren, ist vom Membranpotential abhängig: die Affinität nimmt zu positiven Membranpotentialen hin ab (Hagiwara et al., 1976). Der Cs^+ -Block wurde unter stark und unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen untersucht, wobei die Transfektion nach dem gleichen Schema wie in 3.3. beschrieben erfolgte. Die Abhängigkeit des Blocks vom Membranpotential wurde mittels Strom-Spannungskennlinien in Gegenwart von Cs^+ -Ionen bestimmt. Der GIRK-Kanal-Strom in Gegenwart von 3 mM Cs^+ wurde als Differenz aus dem Membranstrom in Gegenwart von 3 mM Cs^+ und dem Membranstrom in Gegenwart von 1 mM Ba^{2+} berechnet. Der Quotient aus dem GIRK-Kanal-Strom in Gegenwart von 3 mM Cs^+ und dem GIRK-Kanal-Strom ohne Gegenwart von Cs^+ -Ionen ($I_{\text{GIRK}(3 \text{ mM } \text{Cs}^+)}/I_{\text{GIRK}}$) wurde eingeführt, um den Block des GIRK-Kanals zu quantifizieren; er wird im Folgenden als „relativer GIRK-Kanal-Strom in Gegenwart von 3 mM Cs^+ “ bezeichnet.

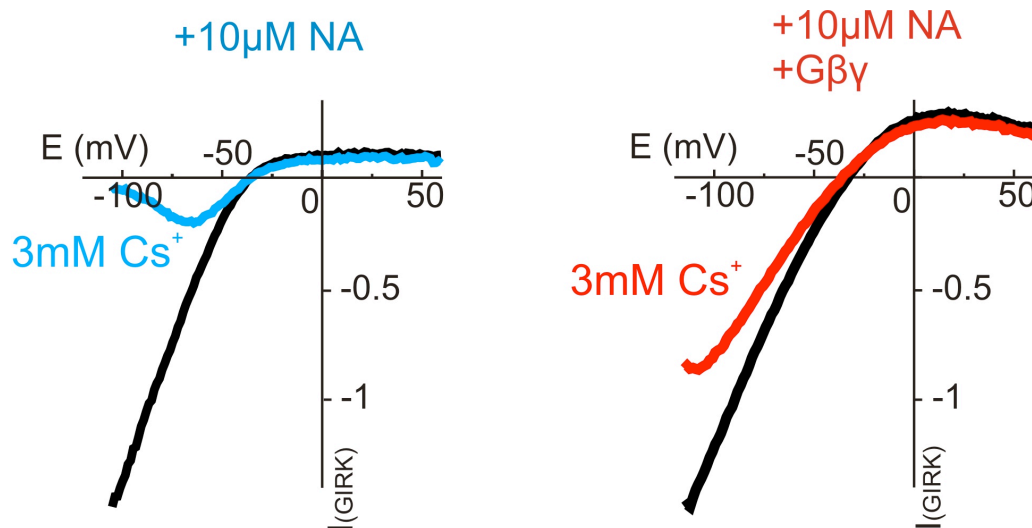


Abbildung 9: Beispiele für die Abhängigkeit des GIRK-Kanal-Stroms vom Membranpotential in Gegenwart von 3 mM Cs^+ unter stark (links) und unter schwach (rechts) einwärtsgerichtenden Bedingungen

Der Block des GIRK-Kanals durch Cs^+ -Ionen war unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen (rechts) im Vergleich zu stark einwärtsgerichtenden Bedingungen (links) abgeschwächt. Strom-Spannungskennlinien von GIRK-Kanälen wurden in Gegenwart von 3 mM Cs^+ und zur Kontrolle ohne Gegenwart von Cs^+ -Ionen gemessen. Der GIRK-Kanal wurde durch Stimulation des α_{2A} -Rezeptors mit 10 μM Noradrenalin (NA) aktiviert. Für schwach einwärtsgerichtende Bedingungen wurden zusätzlich $G\beta\gamma$ -Dimere koexprimiert. Der GIRK-Kanal-Strom wurde anhand des Membranstroms bestimmt, der durch 1 mM Ba^{2+} geblockt werden konnte (vgl. 2.4.2.).

Abbildung 9 zeigt exemplarisch die Abhängigkeit des GIRK-Kanal-Stroms vom Membranpotential in und ohne Gegenwart von 3 mM Cs⁺ sowohl unter stark als auch unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen.

Das linke Diagramm in Abbildung 10 zeigt, dass bei -90 mV Membranpotential unter stark einwärtsgleichrichtenden Bedingungen der relative GIRK-Kanal-Strom in Gegenwart von 3 mM Cs⁺ 15% ± 2,6% und unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen 72% ± 4% beträgt. Dies bedeutet, dass unter stark einwärtsgleichrichtenden Bedingungen 85% ± 2,6% und unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen 28% ± 4% des GIRK-Kanal-Stroms geblockt werden. Der relative Block des GIRK-Kanal-Stroms durch 3 mM Cs⁺ berechnet sich demnach als $1 - I_{\text{GIRK}(3 \text{ mM Cs}^+)}/I_{\text{GIRK}}$. Im rechten Diagramm in Abbildung 9 ist der relative Block des GIRK-Kanal-Stroms durch 3 mM Cs⁺ für jede untersuchte Zelle einzeln in Abhängigkeit von der Stärke der Einwärtsgleichrichtung des GIRK-Kanal-Stroms dieser Zelle aufgetragen. Je schwächer die Einwärtsgleichrichtung des GIRK-Kanals (je größer F_{ir}), desto geringer war der GIRK-Kanal-Block durch 3 mM Cs⁺ bei -90 mV Membranpotential.

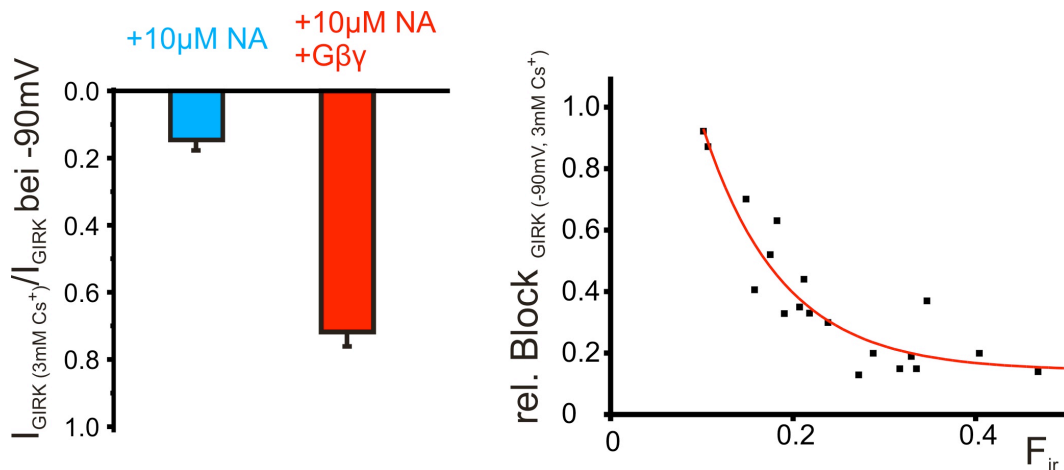


Abbildung 10: Abhängigkeit des GIRK-Kanal-Blocks durch 3 mM Cs⁺ von der Stärke der Einwärtsgleichrichtung bei -90mV Membranpotential

In der linken Abbildung ist der relative GIRK-Kanal-Strom in Gegenwart von 3mM Cs⁺ unter stark (blau) und unter schwach (rot) einwärtsgleichrichtenden Bedingungen bei -90mV Membranpotential dargestellt. Die rechte Abbildung zeigt für jedes Experiment der linken Abbildung einzeln den relativen Block des GIRK-Kanals durch 3 mM Cs⁺ bei -90 mV Membranpotential in Abhängigkeit vom Einwärtsgleichrichtungsquotienten F_{ir}. Der GIRK-Kanal wurde durch Stimulation des α_{2A}-Rezeptors mit 10 μM Noradrenalin (NA) aktiviert. Für schwach einwärtsgleichrichtende Bedingungen wurden zusätzlich Gβγ-Dimere koexprimiert. Der GIRK-Kanal-Strom wurde anhand des Membranstroms bestimmt, der durch 1 mM Ba²⁺ geblockt werden konnte (vgl. 2.4.2.).

Abbildung 11 zeigt die Membranpotentialabhängigkeit des relativen GIRK-Kanal-Stroms in Gegenwart von 3 mM Cs⁺. Es wurde exemplarisch je eine Zelle mit schwach (F_{ir}=0,20), stärker (F_{ir}=0,14), und stark (F_{ir}=0,10) einwärtsgleichrichtenden GIRK-Kanälen ausgewertet.

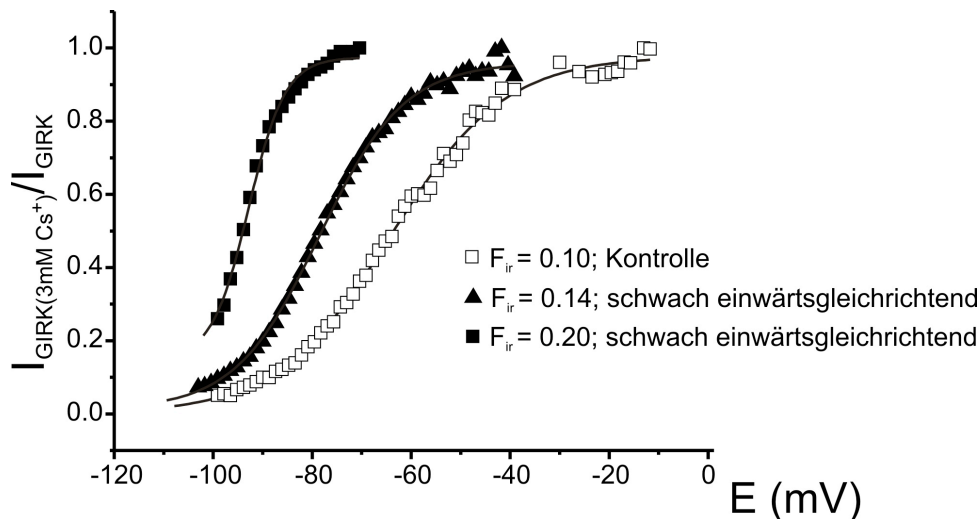


Abbildung 11: Abhängigkeit des relativen GIRK-Kanal-Stroms in Gegenwart von 3 mM Cs⁺ vom Membranpotential und von der Stärke der Einwärtsgleichrichtung

Für drei Zellen mit verschiedenen Einwärtsgleichrichtungsquotienten aus den Experimenten von Abbildung 10 ist exemplarisch die Abhängigkeit des relativen GIRK-Kanal-Stroms in Gegenwart von 3 mM Cs⁺ vom Membranpotential gezeigt. Der GIRK-Kanal wurde durch Stimulation des α_{2A} -Rezeptors mit 10 μ M Noradrenalin (NA) aktiviert. Für schwach einwärtsgleichrichtende Bedingungen wurden zusätzlich G $\beta\gamma$ -Dimere koexprimiert. Der GIRK-Kanal-Strom wurde anhand des Membranstroms bestimmt, der durch 1mM Ba²⁺ geblockt werden konnte (vgl. 2.4.2.).

Die Membranpotentialabhängigkeit des relativen GIRK-Kanal-Stroms in Gegenwart von 3 mM Cs⁺ lässt sich mathematisch mit dem Woodhull-Modell (Formel 3) nähern.

Das Woodhull-Modell wurde entwickelt, um den Kanalblock durch die reversible Bindung eines Ions, das den Kanal nicht passieren kann, im elektrischen Feld eines Na⁺-Kanals zu beschreiben. Wenn das Membranpotential innerhalb der Zellmembran zwischen intra- und extrazellulärer Seite linear verläuft, repräsentiert δ die Tiefe der Bindungsstelle des blockierenden Ions relativ zur Dicke der Zellmembran (Woodhull, 1973; Becker et al., 1996).

Formel 3: Stärke eines Ionenkanal-Stroms bei einem membranpotentialabhängigen, kompetitiven Block durch ein anderes Ion

$$\frac{I(E)}{I_0(E)} = \frac{1}{1 + e^{\frac{-zF\delta(E-E_{50})}{RT}}}$$

Der Parameter z bezeichnet die Valenz des Ions, δ die elektrische Distanz am Ort der Bindung, F die Faraday-Konstante, E das Membranpotential, E_{50} das Membranpotential, bei dem der Ionenkanal-Strom zu 50% blockiert ist, R die Rydberg-Konstante und T die absolute Temperatur. $I(E)$ beschreibt den membranpotentialabhängigen Strom in Gegenwart eines blockierenden Ions, $I_0(E)$ den membranpotentialabhängigen Strom ohne die Gegenwart dieses Ions.

In Tabelle 4 sind δ und das Membranpotential E_{50} , bei dem der GIRK-Kanal-Strom in Gegenwart von 3 mM Cs^+ zu 50% blockiert wird, der drei exemplarischen Zellen aus Abbildung 11 nach Auswertung gemäß des Woodhull-Modells angegeben. δ war in allen Fällen größer als 1 (siehe 4.3.). E_{50} nahm mit zunehmender Stärke der Einwärtsgleichrichtung (sinkender F_{ir}) positivere Werte an. Diese Ergebnisse unterstützen, dass Cs^+ -Ionen den GIRK-Kanal unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen mit einer geringeren Affinität blockieren als unter stark einwärtsgleichrichtenden Bedingungen.

Tabelle 4: Parameter des GIRK-Kanal-Blocks durch 3 mM Cs^+ nach dem Woodhull-Modell in drei exemplarischen Zellen mit verschiedenen Einwärtsgleichrichtungsquotienten

Einwärtsgleichrichtungs- quotient F_{ir}	δ	E_{50}
0,20	6,9	-93mV
0,14	3,0	-79mV
0,10	2,2	-30mV

Zusammengefasst sind die Ergebnisse des Versuchs ein weiterer Hinweis dafür, dass unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen im GIRK-Kanal die Konformation von Strukturen nahe des Selektivitätsfilters verändert sein könnte.

4. Diskussion

4.1. Die Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung des GIRK-Kanals ist Folge der Bindung von G β γ -Dimeren

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass GIRK-Kanäle durch Bindung von G β γ -Dimeren nicht nur aktiviert, sondern auch in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften verändert werden können. Eine Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung des GIRK-Kanals konnte sowohl physiologisch in Myozyten bei starker Rezeptoraktivierung als auch in HEK-293-Zellen unter heterologer Expression von GIRK-1, GIRK-4, G β ₁, G γ ₂ und α _{2A}-AR-G α _{i1}-Fusionsprotein bei starker Rezeptoraktivierung beobachtet werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen sprechen dafür, dass die Bindung von G β γ -Dimeren an den GIRK-Kanal die Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung vermittelt. Ohne zusätzliche Koexpression von G β γ -Dimeren zeigten heterolog exprimierte GIRK-Kanäle bei Aktivierung des Rezeptors durch Stimulation mit einem Agonist eine starke Einwärtsgleichrichtung. Nur bei zusätzlicher Koexpression von G β γ -Dimeren wurde bei Rezeptoraktivierung die Einwärtsgleichrichtung von GIRK-Kanälen abgeschwächt. Die Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung wurde größer, je größer das Verhältnis von transfizierter Menge an DNA für G β γ -Dimer zu DNA für GIRK-Kanal war.

Wieviele G β γ -Dimere an den GIRK-Kanal binden müssen um diesen Effekt zu vermitteln, ließ sich experimentell in den vorliegenden Untersuchungen nicht klären. In einigen Experimenten konnten GIRK-Kanal-Ströme unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen bei -90 mV Membranpotential (also in Einwärtsrichtung) durch Rezeptoraktivierung nicht weiter gesteigert werden. Eine Zunahme der GIRK-Kanal-Ströme durch Rezeptoraktivierung war in diesen Zellen nur bei Membranpotentialen positiv des Kalium-Gleichgewichtspotentials (also in Auswärtsrichtung) möglich. Diese Beobachtung zeigt, dass die Einwärtsgleichrichtung bei maximaler Aktivierung des GIRK-Kanals abgeschwächt wird; möglicherweise wenn vier G β γ -Dimere an den GIRK-Kanal binden. Konventionelle Versuche wie z.B. eine Bestimmung der G β γ -Expression und GIRK-Kanal Expression mittels Western-Blot würden hier ebenfalls nicht weiterhelfen, da man zuerst zeigen müsste, dass sich

alle Zellen nach einer Transfektion bzgl. der Einwärtsgleichrichtung gleich verhalten und die Menge der exprimierten Proteine auch mit der Menge der gebundenen Proteine in einer bekannten Art korreliert. Allerdings könnten neue Methoden, die auf einem Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer zwischen fluoreszenzmarkiertem GIRK-Kanal und G β γ -Dimer basieren eine genauere Analyse der Stöchiometrie erlauben.

In der Literatur wurde eine lokale Veränderung des Kaliumgradienten an der Zellmembran bei starker Kalium-Kanal-Aktivität beschrieben (Bender et al., 2004). Könnte eine lokale Veränderung des Kaliumgradienten die Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung erklären? Alle untersuchten Zellen wurden vor der Bestimmung von Strom-Spannungskennlinien oder Membranpotentialsprüngen auf -90 mV bzw. -120 mV Membranpotential geklemmt. Im Vergleich zu stark einwärtsgleichrichtenden Bedingungen könnte es unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen zu einer Zunahme des Kaliumgradienten und damit zu einem negativeren Kalium-Gleichgewichtspotential kommen. Die beschriebene Zunahme des Kaliumgradienten stellt sich im Laufe von Sekunden ein (Bender et al., 2004). Nach einem Membranpotentialsprung auf +60 mV würde dann unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen eine höhere Triebkraft für den GIRK-Kanal-Strom bestehen. Direkt nach einem solchen Membranpotentialsprung könnte demnach unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen ein stärkerer GIRK-Kanal-Strom in Auswärtsrichtung fließen als unter stark einwärtsgleichrichtenden Bedingungen. Im Verlauf müsste der Kaliumgradient unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen dann jedoch wieder abnehmen. Im Vergleich zu stark einwärtsgleichrichtenden Bedingungen sollte es also unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen zu einem stärker ausgeprägten und kinetisch veränderten Rückgang des GIRK-Kanal-Stroms kommen. Dies wurde aber in den Untersuchungen nicht gefunden: die Kinetik und das Ausmaß des Rückganges waren unter beiden Bedingungen identisch. Darüber hinaus zeigten langsame und schnelle Spannungsrampen (vgl. 2.4.2.) unter beiden Bedingungen die gleiche Strom-Spannungskennlinie, ohne dass sich eine Veränderung des Kalium-Gleichgewichtspotentials zeigte, wie sie bei schnellen Spannungsrampen unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen beobachtbar hätte sein sollen. Daher scheint eine

lokale Abnahme des Kaliumgradienten als wesentliche Ursache der abgeschwächten Einwärtsgleichrichtung unwahrscheinlich.

Physiologisch sind einwärtsgleichrichtende Kalium-Kanäle für die Stabilisierung des Ruhemembranpotentials bedeutend. Das Ruhemembranpotential liegt unter physiologischen Bedingungen leicht positiv des Kalium-Gleichgewichtspotentials. K^+ -Ionen fließen daher durch den GIRK-Kanal unter physiologischen Bedingungen in Auswärtsrichtung. Eine Zunahme der Auswärtsleitfähigkeit des GIRK-Kanals (wie bei Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung der Fall) kann demnach einen bedeutenden Einfluss auf die Generierung von Aktionspotentialen oder Schrittmacherpotentialen haben. Die erhöhte Kalium-Leitfähigkeit hätte einen hyperpolarisierenden Einfluß auf die Zelle und würde dadurch eine Depolarisation der Zellmembran erschweren oder sogar verhindern. Um ein Aktionspotential auszulösen, müssten die Ströme depolarisierender Ionenkanäle in Gegenwart von schwach einwärtsgleichrichtenden GIRK-Kanälen möglicherweise höher sein, als es die Expression depolarisierender Ionenkanäle erlauben würde. An den Schrittmacherzellen des Atriums könnte es daher durch eine Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung von GIRK-Kanälen zu einem Erliegen der Schrittmacherfunktion kommen. Es scheint sehr wahrscheinlich, dass die Konzentration von Acetylcholin im synaptischen Spalt in vivo hoch genug sein könnte um eine Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung atrialer GIRK-Kanäle zu erreichen (Campbell et al., 1989). Eine abgeschwächte Einwärtsgleichrichtung von GIRK-Kanälen durch eine hohe Acetylcholin Konzentration im synaptischen Spalt könnte daher einen möglichen molekularen Mechanismus des durch den N. Vagus bedingten, reversiblen Sinus-Arrest darstellen.

4.2. Der GIRK-Kanal-Block durch Polyamine und Mg^{2+} -Ionen ist unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen nicht verändert

Die Literatur beschreibt als wesentlichen molekularen Mechanismus der Einwärtsgleichrichtung einen Block des GIRK-Kanals durch intrazelluläre Polyamine und Mg^{2+} -Ionen bei Membranpotentialen positiv des Kalium-Gleichgewichtspotentials (Shyng et al., 1996; Yamada et al., 1998; Lancaster et al., 2000). Unter schwach

einwärtsgerichtenden Bedingungen wurde in den Untersuchungen keine Verringerung der Affinität, mit der intrazelluläre Polyamine und Mg^{2+} -Ionen den GIRK-Kanal blockieren, gefunden. Die Kinetik, mit der Polyamine den GIRK-Kanal bei Membranpotentialsprüngen blockieren, war nicht verändert; eine Erhöhung der intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration um den Faktor 20 erzeugte keine Stärkung der Einwärtsgleichrichtung, was bei einer verringerten Bindungsaffinität von Mg^{2+} -Ionen erwartet worden wäre.

Neuere Ergebnisse zeigen bei GIRK- und Kir2.1-Kanälen einen Zusammenhang zwischen Stärke der Einwärtsgleichrichtung und Permeation des Polyamins Spermin durch den Kanal (Makary et al., 2005). Könnte eine erhöhte Spermin-Permeation Ursache der Schwächung der Einwärtsgleichrichtung sein? Zwei Befunde sprechen gegen diese Möglichkeit. Zum einen scheint eine verstärkte Permeation von Polyaminen nur bei einer gleichzeitig verringerten Affinität der Polyamine für die Blockade des GIRK-Kanals möglich; dies konnte nicht beobachtet werden. Zum anderen würde eine verstärkte Permeation von Polyaminen, insbesondere bei Membranpotentialen positiv des Kalium-Gleichgewichtspotentials, zu einem intrazellulären Verlust von Polyaminen führen. GIRK-Kanal-Auswärtsströme unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen sollten demnach, aufgrund einer abnehmenden intrazellulären Spermin-Konzentration, mit der Zeit größer werden; die Einwärtsgleichrichtung sollte dann irreversibel schwach einwärtsgleichrichtend werden. In den Untersuchungen gab es hierfür keinen Anhaltspunkt: die Einwärtsgleichrichtung war unter Stimulation mit Agonist nur reversibel abgeschwächt. Es erscheint unwahrscheinlich, dass eine Zelle einen solchen Verlust von Polyaminen innerhalb sehr kurzer Zeit durch eine neue Synthese von Polyaminen ausgleichen kann.

4.3. GIRK-Kanäle werden durch Ba^{2+} - und Cs^+ -Ionen unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen mit geringerer Affinität blockiert

Im Gegensatz zur Bindungsaffinität von Polyaminen und Mg^{2+} -Ionen war die Affinität, mit der Ba^{2+} - und Cs^+ -Ionen den GIRK-Kanal blockieren unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen reduziert. Der Hill-Koeffizient für die

Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Ba^{2+} -Blocks betrug unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen 2,0 und unter stark einwärtsgerichtenden Bedingungen 1,1. Nach der gängigen Interpretation des Hill-Koeffizienten könnte dieses Ergebnis dafür sprechen, dass unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen die Bindung eines Ba^{2+} -Ions im Kanal die Bindung eines zweiten Ba^{2+} -Ions begünstigt, also eine Kooperativität vorliegt. Unter stark einwärtsgerichtenden Bedingungen hingegen könnte der GIRK-Kanal eine Konformation annehmen, die die zweite Bindungsstelle für Ba^{2+} -Ionen unzugänglich macht oder aufhebt.

Im Woodhull-Modell für den Cs^+ -Block zeigte sich ein δ von über 1. Für dieses Ergebnis gibt es keine sinnvolle physikalische Erklärung. Es suggeriert für die Bindung eines Cs^+ -Ions einen Ort innerhalb des GIRK-Kanals, an dem das elektrische Feld stärker als das bestehende Membranpotential der Zelle ist. Zwar könnten lokale Ungleichverteilungen des elektrischen Feldes innerhalb von Transmembran-Proteinen vorkommen (Hille, 2001), jedoch können diese aus Gründen der Energieerhaltung kein $\delta > 1$ erklären. Somit trifft das einfache Bindungsmodell, wie es von Woodhull für den reversiblen Block von Na^+ -Kanälen durch Ionen angenommen wurde, nicht auf den Mechanismus des Cs^+ -Blocks im GIRK-Kanal zu.

Ein Erklärungsversuch für das Ergebnis könnte sein, dass mehrere Bindungsstellen für Cs^+ -Ionen im GIRK-Kanal vorliegen und daher mehrere Cs^+ -Ionen gleichzeitig den Kanal blockieren können. Man könnte dem entsprechend im Woodhull-Modell statt einer Valenz von 1 (wie es für den Block des Kanals durch ein einzelnes Cs^+ -Ion gelten würde) eine Valenz größer 1 annehmen. δ würde dann gemäß der Formel des Woodhull-Modells kleiner als 1 werden. Das größere δ unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen könnte entweder durch eine Verlagerung des Bindungsorts tiefer in das elektrische Feld des Kanals oder auch durch eine Permeation von Cs^+ -Ionen durch den Kanal erklärt werden. Jedoch konnten aktuelle Untersuchungen bei Aminosäuremutationen in der Nähe des GIRK-Kanal-Selektivitätsfilters, die den Kanal schwach einwärtsgerichtet machen, für Cs^+ -Ionen keine erhöhte Permeation beobachten (Makary et al., 2006).

Unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen zeigen GIRK-Kanäle eine Analogie zu physiologisch schwach einwärtsgerichtenden Kalium-Kanälen: Ba^{2+} -Ionen und Cs^+ -Ionen blockieren auch physiologisch schwach einwärtsgerichtende

Kalium-Kanäle mit einer geringeren Affinität (Zhou et al., 1996; Nichols et al., 1997; Lancaster et al., 2000).

4.4. Bindung von G β γ -Dimeren induziert vermutlich eine Konformationsänderung nahe des Selektivitätsfilters des GIRK-Kanals

Wie kann erklärt werden, dass G β γ -Dimere durch Bindung an den intrazellulären C-Terminus des GIRK-Kanals eine Konformationsänderung des Kanals bewirken, durch die der Kanal elektrophysiologische Eigenschaften verliert, die typisch für physiologisch stark einwärtsgerichtete Kalium-Kanäle sind, und elektrophysiologische Eigenschaften annimmt, die typisch für physiologisch schwach einwärtsgerichtete Kalium-Kanäle sind? Ein kompetitiver Effekt zwischen G β γ -Dimeren und den Kationen, die den GIRK-Kanal blockieren können, ist sehr unwahrscheinlich. Da G β γ -Dimere ein Molekulargewicht von ca. 41 kD haben und dementsprechend groß sind (Gilman, 1987), können sie kaum in den Kanal eindringen und eine der bekannten Bindungsstellen von Ba²⁺-, Cs⁺-, Mg²⁺-Ionen und Polyaminen im Inneren des Kanals besetzen oder sterisch behindern.

Es ist wahrscheinlicher, dass die Bindung von G β γ -Dimeren die Einwärtsgleichrichtung abschwächt, indem sie die Konformation des GIRK-Kanals verändert. Daten von Jan und Mitarbeitern (Yi et al., 2001) schlagen vor, dass die Aktivierung von GIRK-Kanälen durch eine Rotation der TM2-Helix der GIRK-Kanal-Untereinheiten bei Bindung von G β γ -Dimeren vermittelt wird. Aufgrund der Größe von G β γ -Dimeren wäre es auch möglich, dass sich an den Kanal gebundene G β γ -Dimere räumlich gegenseitig beeinflussen und dadurch den Kanal Scherkräften aussetzen. Eine Regulierung der Kanalaktivität über mechanische Faktoren ist für andere Kalium-Kanäle beschrieben worden (Ivanova-Nikolova et al., 1997); eine Beeinflussung der Funktion von GIRK-Kanälen über mechanische Faktoren könnte ebenfalls möglich sein.

An welchen Stellen des GIRK-Kanals könnten diese beiden Mechanismen zu Veränderungen der Konformation führen, die die Einwärtsgleichrichtung beeinflussen? Zentrales Ergebnis der Untersuchung der Bindungsaffinitäten von Polyaminen, Mg²⁺-,

Ba²⁺- und Cs⁺-Ionen war, dass nur die Affinitäten von Ba²⁺- und Cs⁺-Ionen unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen verringert waren. Beides sind Ionen, die nahe des Selektivitätsfilters an den GIRK-Kanal binden und diesen blockieren können. Dies legt nahe, dass unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen Strukturbereiche nahe des Selektivitätsfilters verändert sind. Diese Beobachtung lässt sich mit den postulierten GIRK-Kanal-Aktivierungs-Mechanismen und der hypothetischen Struktur des GIRK-Kanals (siehe 1.2.3.) vereinbaren. Dort, wo sich alle vier Untereinheiten räumlich besonders nahe stehen (z.B. in der Nähe des Selektivitätsfilters), ist für eine korrekte physiologische Funktion (wie z.B. am Selektivitätsfilter für die Substitution der Hydrathülle von K⁺-Ionen) ein genau abgestimmtes Zusammenspiel aller vier Untereinheiten notwendig. Konformationsänderungen in diesen Bereichen würden daher vermutlich eine besonders starke funktionale Konsequenz haben. Wenn also mehrere Untereinheiten bei Bindung von Gβγ-Dimeren nur eine geringe Konformationsänderung zeigen, könnte dies in der Summe eine große funktionale Veränderung bewirken.

4.5. Ein Modell für das gating des GIRK-Kanals

Wenn nun die Strukturbereiche des GIRK-Kanals, an denen sich alle vier Untereinheiten räumlich sehr nahe stehen, an der Entstehung der Einwärtsgleichrichtung beteiligt wären (z.B. durch ein membranpotentialabhängiges gating), dann könnten die in 4.4. diskutierten Mechanismen auch zu einer Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung des GIRK-Kanals unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen führen. Strukturen nahe des Selektivitätsfilters oder der Selektivitätsfilter selber könnten demnach in ein membranpotentialabhängiges gating des GIRK-Kanals involviert sein.

Neuere Ergebnisse unterstützen diese Vermutung. Der Selektivitätsfilter von Ksc-Kalium-Kanälen wurde sowohl in einer für Kalium leitenden als auch in einer für Kalium nicht leitenden Konformation gefunden (Berneche et al., 2005; Cordero-Morales et al., 2006). Makary et al. konnten einen Teil der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen durch Mutationen von Aminosäuren des GIRK-Kanal an der Basis des

Selektivitätsfilters (A142V in GIRK-1 und T148V in GIRK-4 bzw. S166L in GIRK-1 und A172L in GIRK-4) replizieren (Makary et al., 2006): es konnte eine signifikante Korrelation zwischen EC_{50} für Cs^+ -Block, Rb^+ - und Spermin-Permeation, Einwärtsgleichrichtungsstärke und Agonist-abhängiger Aktivierung gefunden werden. Einen Überblick über die räumliche Struktur der Aminosäurereste gibt modellhaft Abbildung 12.

Es ist bemerkenswert, dass die alleinige Mutation von Aminosäuren der GIRK-1-Untereinheit keinen Effekt auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals zeigte. Hingegen zeigte die alleinige Mutation entsprechender Aminosäuren der GIRK-4-Untereinheit den gleichen Effekt, wie Mutationen an allen Untereinheiten des Kanals zusammen. Möglicherweise kommt daher der GIRK-4-Untereinheit eine besondere Rolle in der Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen zu. Dies könnte in weiteren Experimenten untersucht werden.

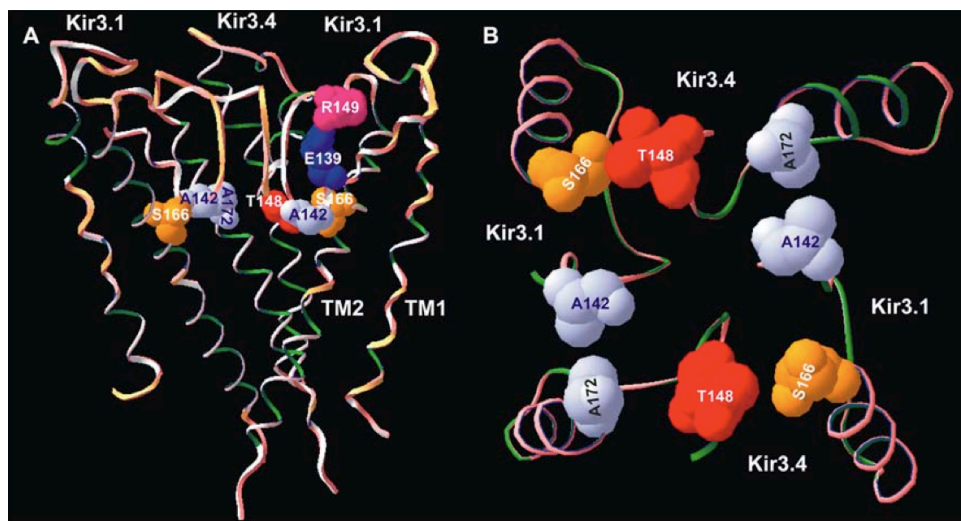


Abbildung 12: Räumliche Anordnung von Aminosäuren an GIRK-1 (Kir3.1) und GIRK-4 (Kir3.4) an der Basis des Selektivitätsfilter, deren Mutation die Einwärtsgleichrichtung und den Block durch Cs^+ -Ionen abschwächen

Die Mutation von A142V (GIRK-1) und T148V (GIRK-4) bzw. S166L (GIRK-1) und A172L (GIRK-4) schwächen den Block durch Cs^+ -Ionen. Die Mutation von E139Q (GIRK-1) schwächt die Einwärtsgleichrichtung bei gleichzeitiger Mutation von T148A (GIRK-4). (A) zeigt die Ansicht von seitlich, (B) von oben auf den Kanal (Makary et al., 2006).

Zusammenfassend scheint es, dass der GIRK-Kanal mindestens zwei gating-Mechanismen besitzt. Ein gate zeigt dabei ein membranpotentialabhängiges

Schaltverhalten. Im Sinne einer „intrinsic“ Einwärtsgleichrichtung kommt es bei einem Membranpotential positiv des Kalium-Gleichgewichtspotentials zu einer Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit des GIRK-Kanals. In Abwesenheit aller den GIRK-Kanal physiologisch blockierenden intrazellulären Kationen würden GIRK-Kanäle somit einen Abfall der Offenwahrscheinlichkeit bei depolarisierenden Membranpotentialen zeigen. Unter Polyamin- und Mg^{2+} -freien Bedingungen wurde in Excised-Patch-Clamp-Experimenten ein Rückgang der GIRK-Kanal-Leitfähigkeit bei stark positiven Membranpotentialen gefunden, der das membranpotentialabhängige gate repräsentieren könnte (Yamada et al., 1995). Da die Bindungsaffinität von Cs^+ - und Ba^{2+} -Ionen, die nahe des Selektivitätsfilters an den GIRK-Kanal binden, unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen reduziert war, könnte man schließen, dass sich dieses membranpotentialabhängige gate nahe des Selektivitätsfilters befindet.

Die Bindung von $G\beta\gamma$ -Dimeren an den GIRK-Kanal würde dann einen zweiten gating-Mechanismus repräsentieren, der nicht nur die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals steigert, sondern möglicherweise auch das membranpotentialabhängige gate des GIRK-Kanals moduliert: je mehr $G\beta\gamma$ -Dimere an den Kanal binden, desto stärker wird der GIRK-Kanal in der Nähe des Selektivitätsfilters räumlich so verändert, dass ein stärker depolarisiertes Membranpotential zum Verschluss des membranpotentialabhängigen gates notwendig ist.

4.6. Ausblick - Änderung des gating-Schaltverhaltens von GIRK-Kanälen unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen

In weiteren Versuchen könnte in Cell-Attached-Patch-Clamp Experimenten geprüft werden, wie sich ein einzelner GIRK-Kanal abhängig vom Membranpotential in Auswärts- und Einwärtsrichtung unter stark und unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen verhält. Derartige Untersuchungen sind bisher nicht durchgeführt worden.

Die Ergebnisse in der Literatur beschreiben das Einzelkanalverhalten von GIRK-Kanälen so, dass GIRK-Kanäle zumeist in einem inaktiven Zustand verharren und aus diesem in einen aktiven Zustand (auch „burst“ genannt) übergehen können (Ivanova-

Nikolova, 1997). Im burst wechseln GIRK-Kanäle rasch zwischen den Funktionszuständen offen und geschlossen. Betrachtet man die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Offenzeiten im burst, zeigen sich bei bestimmten Offenzeiten Maxima. Die Zeiten dieser Maxima werden durch eine Aktivierung des Kanals nicht verändert, es werden lediglich die länger dauernden Offenzeiten mit größerer Wahrscheinlichkeit eingenommen. Diese Maxima werden daher als Konformationen des GIRK-Kanals interpretiert, denen eine Bindung von $G\beta\gamma$ -Dimeren zugrunde liegt (Ivanonva-Nikolova, 1998).

Als Weiterführung der vorliegenden Untersuchungen könnte geprüft werden, ob die Häufigkeit bzw. die Dauer des bursts unter stark und unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen vom Membranpotential abhängig ist. Darüberhinaus könnte untersucht werden, ob unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen im burst eine Veränderung der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Offenzeiten vorliegt.

Falls sich unter schwach einwärtsgerichtenden Bedingungen in der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Offenzeiten findet, dass das Maximum mit den längsten Offenzeiten das Größte ist, würde dies für eine Bindung von vier $G\beta\gamma$ -Dimeren an den GIRK-Kanal sprechen. Wenn entweder die Häufigkeit des bursts oder die Dauer des bursts bei Membranpotentialen positiv vom Kalium-Gleichgewichtspotential verringert ist, könnte dies das postulierte membranpotentialabhängige gating von Strukturen nahe des Selektivitätsfilters des GIRK-Kanals repräsentieren.

5. Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte einwärtsgleichrichtende Kalium-Kanäle sind durch zwei Eigenschaften gekennzeichnet: (I) Die Leitfähigkeit für K^+ -Ionen ist positiv des Kalium-Gleichgewichtspotentials reduziert (einwärtsgleichrichtend) und (II) die Kanal-Aktivität wird durch Bindung von $G\beta\gamma$ -Dimere heterotrimerer G-Proteine reguliert (G-Protein gekoppelt). In der Literatur wurde die Aktivierung von GIRK-Kanälen als eine Zunahme ihrer Offenwahrscheinlichkeit unabhängig vom Membranpotential beschrieben. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass es bei starker Aktivierung des GIRK-Kanals durch $G\beta\gamma$ -Dimere auch zu einer Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung kommt.

Im heterologen Expressionssystem konnte bei Rezeptor-Stimulation mit Agonist die Einwärtsgleichrichtung von GIRK-Kanälen abhängig von der Stärke der Koexpression von $G\beta\gamma$ -Dimeren geschwächt werden. Dieser Effekt entstand nicht durch eine Veränderung der Affinität, mit der Polyamine und Mg^{2+} -Ionen den GIRK-Kanal membranpotentialabhängig blockieren. Die Kinetik, mit der Polyamine den GIRK-Kanal blockieren, war nicht verändert; eine Erhöhung der intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration um den Faktor 20 konnte eine Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung nicht mindern. Es wurde vermutet, dass eine Änderung der Konformation von Strukturen nahe des Selektivitätsfilters die Abschwächung der Einwärtsgleichrichtung verursacht. Gestützt wurde diese Vermutung zum einen dadurch, dass Ba^{2+} - und Cs^+ -Ionen, die von extrazellulärer Seite her den Kanal an Strukturen nahe des Selektivitätsfilters blockieren können, unter schwach einwärtsgleichrichtenden Bedingungen eine geringere Bindungsaffinität hatten und zum anderen dadurch, dass das relative Ausmaß des GIRK-Kanal-Blocks durch Cs^+ -Ionen mit der Stärke der Einwärtsgleichrichtung korrelierte.

Die vorliegenden Untersuchungen sind ein erster Hinweis darauf, dass Strukturen nahe des Selektivitätsfilters des GIRK-Kanals, oder sogar der Selektivitätsfilter selbst, nicht nur die Ionenselektivität bestimmen, sondern auch eine membranpotentialabhängige gating-Funktion ausüben.

6. Literaturverzeichnis

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

Bender K, Wellner-Kienitz MC, Bösch LI, Rinne A, Beckmann C, Pott L (2004) Acute desensitization of GIRK current in rat atrial myocytes is related to K⁺ current flow. *J. Physiol.* **561**, 471-483

Berneche S, Roux B (2005) A gate in the selectivity filter of potassium channels. *Structure* **13**, 591-600

Brandt DR, Ross EM (1986) Catecholamine-stimulated GTPase cycle. Multiple sites of regulation by β -adrenergic receptor and Mg²⁺ studied in reconstituted receptor-Gs vesicles. *J. Biol. Chem.* **261**, 1656-1662

Bünemann M, Hosey MM (1998) Regulators of G protein signaling (RGS) proteins constitutively activate G $\beta\gamma$ -gated potassium channels. *J. Biol. Chem.* **273**, 31186-31190

Bünemann M, Bücheler MM, Philipp M, Lohse MJ, Hein L (2001) Activation and deactivation kinetics of α_{2A} - and α_{2C} -adrenergic receptor-activated G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel currents. *J. Biol. Chem.* **276**, 47512-47517

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

Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preninger A, Mazzoni MR, Hamm HE (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocrine Reviews* **24**, 765-781

Campbell GD, Edwards FR, Hirst GD, O'Shea JE (1989) Effects of vagal stimulation and applied acetylcholine on pacemaker potentials in the guinea-pig heart. *J. Physiol.* **415**, 57-68

Casero RA, Pegg AE (2009) Polyamine catabolism and disease. *Biochem. J.* **421**, 323-338

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

Claydon TW, Makary SY, Dibb KM, Boyett MR (2004) K⁺ activation of Kir3.1/Kir3.4 and Kv1.4 K⁺ channels is regulated by extracellular charges. *Biophys. J.* **87**, 2407-2418

Cordero-Morales JF, Cuello LG, Zhao Y, Jogini V, Cortes DM, Roux B,

- Perozo E (2006) Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 311-318
- Corey S, Clapham DE (2001) The Stoichiometry of Gbeta gamma binding to G-protein-regulated inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs). *J. Biol. Chem.* **276**, 11409-11413
- Dascal N (1997) Signalling via the G protein-activated K⁺ channels. *Cell. Signal.* **9**, 551-573
- De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **255**, 7108-7117
- Douplnik CA, Davidson N, Lester HA, Kofuji P (1997) RGS proteins reconstitute the rapid gating kinetics of G $\beta\gamma$ -activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10461-10466
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77
- Fakler B, Brändle U, Glowatzki E, Weidemann S, Zenner HP, Ruppersberg JP (1995) Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K⁺ channels is caused by intracellular spermine. *Cell* **80**, 149-154
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1256-1272
- Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 615-649
- Hagiwara S, Miyazaki S, Rosenthal NP (1976) Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.* **67**, 621-638
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**, 85-100
- Hein P, Frank M, Hoffmann C, Lohse MJ, Bünemann M (2005) Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. *EMBO J.* **24**, 4106-4114
- He C, Zhang H, Mirshahi T, Logothetis DE (1999) Identification of a potassium channel site that interacts with G protein $\beta\gamma$ subunits to mediate agonist-induced signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 12517-12524

- Heck M, Hofmann KP (2001) Maximal rate and nucleotide dependence of rhodopsin-catalyzed transducin activation: initial rate analysis based on a double displacement mechanism. *J. Biol. Chem.* **276**, 10000–10009
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* **66**, 1061-1067
- Hille B (2001) Ion Channels of Excitable Membranes. *Sinauer*
- Hommers LG, Lohse MJ, Bünemann M (2003) Regulation of the inward rectifying properties of G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels by Gβγ subunits. *J. Biol. Chem.* **278**, 1037-1043
- Huang CL, Jan YN, Jan LY (1997) Binding of the G protein βγ subunit to multiple regions of G protein-gated inward-rectifying K⁺ channels. *FEBS Lett.* **405**, 291-298
- Huang CL, Feng S, Hilgemann DW (1998) Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* **391**, 803-806
- Hubbell WL, Altenbach C, Hubbell CM, Khorana HG (2003) Rhodopsin structure, dynamics, and activation: a perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking. *Adv. Protein Chem.* **63**, 243-290
- Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, Yano R, Sora I, Niki H (2002) Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: is the GIRK channel one of the keys? *Neurosci. Res.* **44**, 121-131
- Inanobe A, Morishige KI, Takahashi N, Ito H, Yamada M, Takumi T, Nishina H, Takahashi K, Kanaho Y, Katada T, Kurachi Y (1995) Binding of the G protein βγ subunit to multiple regions of G protein-gated inward-rectifying K⁺ channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**, 1022-1028
- Ivanova-Nikolova TT, Breitwieser GE (1997) Effector contributions to Gβγ-mediated signaling as revealed by muscarinic potassium channel gating. *J. Gen. Physiol.* **109**, 245-253
- Ivanova-Nikolova TT, Nikolov EN, Hansen C, Robishaw JD (1998) Muscarinic K⁺ channel in the heart. Modal regulation by G protein beta gamma subunits. *J. Gen. Physiol.* **112**, 199-210
- Ji TH, Grossmann M, Ji I (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* **273**, 17299-17302
- Jiang Y, MacKinnon R (2000) The barium site in a potassium channel by x-ray crystallography. *J. Gen. Physiol.* **115**, 269-272
- Jin T, Peng L, Mirshahi T, Rohacs T, Chan KW, Sanchez R, Logothetis DE (2002) The

$\beta\gamma$ subunits of G proteins gate a K^+ channel by pivoted bending of a transmembrane segment. *Mol. Cell.* **10**, 469–481

Jurman ME, Boland LM, Liu Y, Yellen G (1994) Visual identification of individual transfected cells for electrophysiology using antibody-coated beads. *Biotechniques* **17**, 876-881

Kenakin T (2002) Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 103-110

Klinke R, Silberagl S (1996) Lehrbuch der Physiologie – 2. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart

Klein S, Reuveni H, Levitzki A (2000) Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 3219–3223

Kobilka BK (2007) G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 794-807

Kobilka BK, Deupi X (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 397-406

Kobrinisky E, Mirshahi T, Zhang H, Jin T, Logothetis DE (2000) Receptor-mediated hydrolysis of plasma membrane messenger PIP2 leads to K^+ -current desensitization. *Nat. Cell. Biol.* **2**, 507-514

Kunkel MT, Peralta EG (1995) Identification of domains conferring G protein regulation on inward rectifier potassium channels. *Cell* **83**, 443-449

Krapivinsky G, Krapivinsky L, Wickman K, Clapham DE (1995) $G\beta\gamma$ binds directly to the G protein-gated K^+ channel, I_{KACH} . *J. Biol. Chem.* **270**, 29059-29062

Krapivinsky G, Kennedy ME, Nemecek J, Medina I, Krapivinsky L, Clapham DE (1998) $G_{\beta\gamma}$ binding to GIRK4 subunit is critical for G protein-gated K^+ channel activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 16946-16952

Lambert, N (2008) Dissociation of heterotrimeric g proteins in cells. *Science signaling* **1**, re5

Lancaster MK, Dibb KM, Quinn CC, Leach R, Lee JK, Findlay JB, Boyett MR (2000) Residues and mechanisms for slow activation and Ba^{2+} block of the cardiac muscarinic K^+ channel, Kir3.1/Kir3.4. *J. Biol. Chem.* **275**, 35831-35839

Lesage F, Duprat F, Fink M, Guillemare E, Coppola T, Lazdunski M, Hugnot JP (1994) Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K^+ channels in the brain. *FEBS Lett.* **353**, 37-42

Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE (1987) The $\beta\gamma$ subunits of

GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* **325**, 321-326

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

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

Lujan R, Maylie J, Adelman JP (2009) New sites of action for GIRK and SK channels, *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 475-480

Mao J, Wang X, Chen F, Wang R, Rojas A, Shi Y, Piao H, Jiang C (2004) Molecular basis for the inhibition of G protein-coupled inward rectifier K⁺ channels by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 1087-1092

Makary SMY, Claydon TW, Enkvetchakul D, Nichols CG, Boyett MR (2005) A difference in inward rectification and polyamine block and permeation between the Kir2.1 and Kir3.1/Kir3.4 K⁺ channels. *J. Physiol.* **568**, 749-766

Makary SMY, Claydon TW, Dibb KM, Boyett MR (2006) Base of pore loop is important for rectification, activation, permeation, and block of Kir3.1/Kir3.4. *Biophys. J.* **90**, 4018-4034

Medina I, Krapivinsky G, Arnold S, Koovor P, Krapivinsky L Clapham DE (2000) A switch mechanism for G beta gamma activation of I_{K_{ACh}}. *J. Biol. Chem.* **275**, 29709-29716

Neubig RR (1994) Membrane organization in G-protein mechanisms. *FASEB J.* **8**, 939-946

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

Oldham WM, Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**, 60-71

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 639-650

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

Politi HC, Preston RR (2003) Is it time to rethink the role of Mg²⁺ in membrane excitability? *Neuroreport* **14**, 659-668

Riven I, Iwanir S, Reuveny E (2006) GIRK channel activation involves a local rearrangement of a preformed G protein channel complex. *Neuron* **51**, 561-573

Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356-363

Ross EM, Wilkie TM (2000) GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 795-827

Sadja R, Smadja K, Alagem N, Reuveny E (2001) Coupling G $\beta\gamma$ -dependent activation to channel opening via pore elements in inwardly rectifying potassium channels. *Neuron* **29**, 669–680

Sadja R, Alagem N, Reuveny E (2002) Graded contribution of the G $\beta\gamma$ binding domains to GIRK channel activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 10783-10788

Sadja R, Alagem N, Reuveny E (2003) Gating of GIRK channels: details of an intricate, membrane-delimited signaling complex. *Neuron* **39**, 9-12

Sakmann B, Noma A, Trautwein W (1983) Acetylcholine activation of single muscarinic K⁺ channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart. *Nature* **303**, 250-253

Schmidt RF, Lang F (2007) Physiologie des Menschen – 30. Auflage. *Springer Berlin*

Sharon D, Vorobiov D, Dascal N (1997) Positive and negative coupling of the metabotropic glutamate receptors to a G protein-activated K⁺ channel, GIRK, in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* **109**, 477-490

Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, Kim YJ, Krauss N, Choe HW, Hofmann KP, Ernst OP (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* **455**, 497-502

Shein HM, Enders JF (1962) Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **48**, 1164-1172

Shieh RC, Chang JC, Arreola, J (1998) Interaction of Ba²⁺ with the pores of the cloned inward rectifier K⁺ channels Kir2.1 expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* **75**, 2313-2322

Shyng SL, Sha Q, Ferrigni T, Lopatin AN, Nichols CG (1996) Depletion of intracellular polyamines relieves inward rectification of potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 12014-12019

Signorini S, Liao YJ, Duncan SA, Jan LY, Stoffel M (1997) Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein-coupled, inwardly rectifying K⁺ channel GIRK2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 271-276

Silverman SK, Lester HA, Dougherty DA (1996) Subunit stoichiometry of a

heteromultimeric G protein-coupled inward-rectifier K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* **271**, 30524-30528

Simon MI, Strathmann MP, Gautam, N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**, 802–808

Sohn JW, Lim A, Lee SH, Ho WK (2007) Decrease in PIP(2) channel interactions is the final common mechanism involved in PKC- and arachidonic acid-mediated inhibitions of GABA_B-activated K⁺ current. *J. Physiol.* **582**, 1037-1046

Stryer L (1986) Cyclic GMP cascade of vision. *Annu. Rev. Neurosci.* **9**, 87-119

Takigawa T, Alzheimer C (1999) Variance analysis of current fluctuations of adenosine- and baclofen-activated GIRK channels in dissociated neocortical pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* **82**, 1647-1650

Tjio JH, Puck TT (1958) Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J. Exp. Med.* **108**, 259-268

Thompson GA, Leyland ML, Ashmole I, Sutcliffe MJ, Stanfield P (2000) Residues beyond the selectivity filter of the K⁺ channel Kir2.1 regulate permeation and block by external Rb⁺ and Cs⁺. *J. Physiol.* **526**, 231-240

Tolkovsky AM, Levitzki A (1978) Mode of coupling between the β-adrenergic receptor and adenylate cyclase in turkey erythro- cytes. *Biochemistry* **17**, 3795

Vartdal F, Gaudernack G, Funderud S, Bratlie A, Lea T, Ugelstad J, Thorsby E (1986) HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation--a fast and reliable technique. *Tissue Antigens.* **28**, 301-312

Weis W, Kobilka BK (2008) Structural insights into G-protein-coupled receptor activation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 734-740

Wickenden A (2002) Potassium channels as anti-epileptic drug targets. *Neuropharmacology* **43**, 1055-1060

Wickman K, Krapivinsky G, Corey S, Kennedy M, Nemej J, Medina I, Clapham DE (1999) Number and stoichiometry of subunits in the native atrial G-protein-gated K⁺ channel, I_{KACH}. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **868**, 386-398

Wise A, Carr IC, Milligan G (1997) Measurement of agonist-induced guanine nucleotide turnover by the G-protein G_{i1}α when constrained within an α_{2A}-adrenoceptor-G_{i1}α fusion protein. *Biochem. J.* **325**, 17-21

Woodhull AM (1973) Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J. Gen. Physiol.* **61**, 687-708

Xiao J, Zhen XG, Yang J (2003) Localization of PIP2 activation gate in inward rectifier

K⁺ channels. *Nat. Neurosci.* **6**, 811-818

Yamada M, Kurachi Y (1995) Spermine gates inward-rectifying muscarinic but not ATP-sensitive K⁺ channels in rabbit atrial myocytes. Intracellular substance-mediated mechanism of inward rectification. *J. Biol. Chem.* **270**, 9289-9294

Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y (1998) G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol. Rev.* **50**, 723-760

Yi BA, Lin YF, Jan YN, Jan LY (2001) Yeast screen for constitutively active mutant G protein-activated potassium channels. *Neuron* **29**, 657-667

Zhou H, Chepilko S, Schutt W, Choe H, Palmer LG, Sackin H (1996) Mutations in the pore region of ROMK enhance Ba²⁺ block. *Am. J. Physiol.* **271**, 1949-1956

7. Abkürzungsverzeichnis

α_{2A} -AR	α_{2A} -adrenerger Rezeptor
ACh	Acetylcholin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cAMP	Adenosin-3',5'-monophosphat
cGMP	Guanosin-3',5'-monophosphat
DMEM	Englisch: dulbecco's modified eagle medium
DNA	Englisch: deoxyribonucleic acid
EDTA	Englisch: ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	Englisch: ethylene glycol tetraacetic acid, auch Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure)
GABA	γ -Aminobuttersäure
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GIRK	Englisch: G protein coupled inwardly rectifying K ⁺
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IRES	Englisch: internal ribosomal entry site
LB	Englisch: lysogeny broth
NA	Noradrenalin
NMDA	N-methyl-D-aspartat Säure
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PP2A	Phosphoprotein Phosphatase 2A
RGS	Englisch: regulators of G protein signaling
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, auch 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TM	Transmembrandomäne

Danksagung

Ich danke Moritz Bünemann für seinen Entschluß im Jahr 2000 nach Würzburg zu kommen, mir dieses Thema anzuvertrauen und mich seitdem fortwährend zu unterstützen.

Ich danke Monika Frank für die Einarbeitung in die Molekularbiologie, die Aufmunterung bei Rückschlägen in den Versuchen und den immerzu freundschaftlichen Umgang im Labor.

Ich danke Susanne Röckl für die hilfreiche und detaillierte Diskussion.

Ich danke Martin Lohse für die Möglichkeit an seinem Institut zu promovieren.