

Aus dem Institut für Physiologie

der Universität Würzburg

-Lehrstuhl für Physiologie II-

Vorstand: Professor Dr. med. Manfred Heckmann

**Die funktionelle Bedeutung der Heteromerisierung von Serotonin-1A und
Serotonin-7 Rezeptoren**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Matthias Klaus Fröhlich

aus Würzburg

Würzburg, November 2010

Referent: Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Sebastian Maier

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung :02.03.2011

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Der Neurotransmitter Serotonin.....	1
1.2 Serotoninrezeptoren	1
1.2.1 5-HT _{1A} Rezeptor.....	4
1.2.2 5-HT ₇ Rezeptor	6
1.2.3 Homo- und Heteromerisierung G- Protein gekoppelter Rezeptoren	8
1.3 Kaliumkanäle	10
1.3.1 Tandem-Poren- Kaliumkanäle	12
1.3.1.1 TASK Kanäle	15
1.3.2 Kir- Kanäle.....	16
1.3.2.1 Kir3- Kanäle (GIRK- Kanäle).....	19
1.4 Zielsetzung	21
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Materialien	23
2.1.1 Chemikalien.....	23
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.3 Verwendete Geräte und Apparaturen.....	24

2.1.4	Rezepte für Nährmedien, Puffer und Gele.....	25
2.1.5	Reagenziensets (Kits).....	28
2.1.6	Biologische Materialien.....	29
2.1.7	Molekularbiologische Materialien.....	29
2.1.8	Computerprogramme.....	30
2.2	Molekularbiologische Methoden	31
2.2.1	Herstellung des GFP- GIRK 1/2 pSGEM- Klons	31
2.2.1.1	Restriktion der DNA- Fragmente.....	31
2.2.1.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	32
2.2.1.3	Isolierung von DNA- Fragmenten aus Agarosegelen	33
2.2.1.4	Ligation	33
2.2.1.5	Transformation	34
2.2.1.6	Präparation von Plasmid- DNA aus 4 ml Bakterienkultur - MINI	35
2.2.1.7	Präparation von Plasmid- DNA aus 50 ml Bakterienkulturen - MIDI.....	35
2.2.1.8	RNA- Synthese durch in vitro Transkription.....	36
2.2.1.9	Sequenzierung von DNA	39
2.2.1.10	RNA- Aufreinigung und Quantifizierung	40
2.2.2	Fluoreszenzmessungen.....	40
2.2.2.1	Fluoreszenzdarstellung mittels eines Laser Scanning Mikroskop	40
2.2.2.2	Fluoreszenzmessung an <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	41
2.2.2.3	Statistische Auswertung der Fluoreszenzmessungen.....	41
2.2.3	Präparation der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten für elektrophysiologische Messungen.....	42
2.2.4	Elektrophysiologische Methoden	43
2.2.4.1	Ganzzelleableitungen mittels der Zwei – Elektroden – Spannungsklemme (TEVC)	43
2.2.4.2	Aufbau des Messstandes	44
2.2.4.3	Messelektroden	45
2.2.4.4	Messprotokolle.....	46
2.3	Auswertung der Daten und Statistik.....	47

3	Ergebnisse	49
3.1	Untersuchung der Koexpression der GPCRs 5-HT _{1A} und 5-HT ₇	49
3.1.1	Effekte von Serotonin auf [5-HT _{1A} – GIRK 1/2]-SK.....	49
3.1.2	Untersuchung des Einflusses der Koexpression von 5-HT ₇ auf [5-HT _{1A} – GIRK 1/2]-SK.....	52
3.2	Charakterisierung der physiologischen Eigenschaften der Heterodimerisierung [5-HT _{1A} +5-HT ₇]-R.....	56
3.2.1	Überprüfung der Dosisabhängigkeit der inhibitorischen Wirkung von 5-HT ₇ durch den Vergleich unterschiedlicher cRNA Konzentrationen	56
3.2.2	Heterologe Expression der Rezeptoren 5-HT ₇ , 5-HT _{2C} , H1 und B1	58
3.2.3	Untersuchung des Einflusses der funktionellen Inhibierung des 5-HT ₇ Rezeptors auf die GIRK 1/2 Aktivität	63
3.2.3.1	Untersuchung des Dimers durch den reversen Rezeptorinhibitor Clozapin	63
3.2.3.2	Untersuchung der Desensitisierung des GIRK Stroms	65
3.2.4	Expressionsanalyse des GIRK 1/2 Kanals mittels Fluoreszenzmessungen.....	67
3.2.4.1	Heterologe Expression von GFP- GIRK 1/2 in Kombination mit [5-HT _{1A} +5-HT ₇]-R	67
3.2.4.2	Untersuchung der Fluoreszenz von 5-HT _{1A} – GFP- GIRK 1/2 und [5-HT _{1A} +5-HT ₇]-R – GFP- GIRK 1/2.....	69
3.3	Koexpression von 5-HT _{1A} zu [5-HT ₇ – TASK-1]-SK.....	71
3.3.1	Funktionelle Charakterisierung des 5-HT ₇ Rezeptors	72
3.3.1.1	Elektrophysiologische Messungen an [5-HT ₇ – TASK-1]-SK.....	72
3.3.1.2	Vergleich der Expressionssysteme [5-HT ₇ – TASK-1]-SK und β1 – TASK-1	75
3.3.2	Untersuchung des Expressionssystems [5-HT ₇ – TASK-1]-SK bei der Koexpression von 5-HT _{1A}	79

4	Diskussion.....	83
4.1	Die Heterodimerisierung von GPCRs	84
4.1.1	Die Interaktion zwischen Rezeptor/Rezeptorheterodimer und Ligand.....	84
4.1.2	Molekulare Grundlagen der Heterodimerisierung	86
4.2	Die Heterodimerisierung von 5-HT _{1A} und 5-HT ₇	88
4.2.1	Molekulare Mechanismen der Effekte der Heterodimerisierung ...	88
4.2.2	Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen.....	90
4.2.3	Physiologische Charakterisierung des Heterodimers	92
4.2.4	Beeinflussung der TASK-1 Inhibition durch heterodimere Rezeptoren.....	94
4.3	Biologische bzw. medizinische Bedeutung der Serotoninrezeptoren	95
4.3.1	5-HT Rezeptoren in der Peripherie – physiologische Effekte	96
4.3.2	5-HT Rezeptoren im ZNS – physiologische Effekte.....	96
4.4	Pathophysiologische Bedeutung der Heterodimerisierung	97
4.4.1	Expressionsmuster der 5-HT Rezeptoren 5-HT _{1A} und 5-HT ₇ im ZNS.....	98
4.4.2	Medizinische Relevanz der Heteromerisierung von GPCRs.....	100
5	Zusammenfassung.....	102
	Literaturverzeichnis	104
	Abbildungsverzeichnis.....	120

Abkürzungsverzeichnis

5-CT	5-Carboxamidotryptamin
5-HT	5-Hydroxytryptamin
8 - OH - DPAT	8-Hydroxy-2-(di-N-Propylamino)Tetralin
A	Ampère (Einheit der Stromstärke)
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BRET	<i>Bioluminescence resonance energy transfer</i> – Technik
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
C- Terminus	Carboxyl- Terminus
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cRNA	Copy RNA (Ribonukleinsäure)
CTP	Cytosintriphosphat
Cys	Cystein
ddH ₂ O	doppelt entionisiertes Wasser (<i>double destillated</i> <i>H₂O</i>)
ddNTP	Didesoxynukleotide
Da	Dalton, Einheit der relativen Molmasse
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DNase	Desoxyribonuklease
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GABA _B	γ- Aminobuttersäure (γ- Aminobutyrat) Rezeptor B
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>Green fluorescent Protein</i>
GIRK	G- Protein gekoppelte einwärtsgerichteten K ⁺ -Kanäle (<i>G- Protein coupled inwardly rectifying K⁺-channels</i>)
Glc	Glucose
GPCR	G- Protein gekoppelter Rezeptor (<i>G- protein coupled receptor</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
H	Wasserstoff
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HCN	<i>Hyperpolarization- activated cyclic nucleotide-gated</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
heGFP	<i>human enhanced GFP</i>
InsP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
JPEG	Grafik Format (<i>Joint Photographic Experts group</i>)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
K2P	Tandemporen- Kaliumkanäle
Kir	Einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle
Kv	Spannungs- gesteuerte Kaliumkanäle
LB- Medium	<i>Lysogeny Broth</i> Medium
LSM	<i>Laser Scanning</i> Mikroskop
m (mathematische Einheit)	milli (10 ⁻³) Einheit
M	Molar
Mg ²⁺	Magnesium

MOPS	3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure
mRNA	Boten- RNA (messenger RNA)
N- Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
Ω	Ohm, Einheit des elektrischen Widerstands
P	Porendomäne
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration (lat.: <i>pondus Hydrogenii</i>)
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PLC	Phospholipase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PNS	peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
REM	<i>rapid eye movement</i> - Schlafphase
RGS	Regulator- Proteine (<i>Regulators of G- Protein Signaling</i>)
SEM	Standardfehler
Ser	Serin
STABW	Standardabweichung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TASK	<i>Twik- related- acid- sensitive- K⁺- Channel</i>
Tet	Tetrazyklin
TEVC	Zwei- Elektroden- Spannungsklemme (<i>two- electrode- voltage- clamp</i>)
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris- (Hydroxymethyl-) aminomethan
u	Einheit (<i>unit</i>)

UK	Großbritannien (<i>United Kingdom</i>)
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
Tet	Tetrazyklin
V	Volt (Einheit der Stromspannung)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Der Neurotransmitter Serotonin

Serotonin als physiologischer Wirkstoff war bereits seit der Mitte des 19. Jahrhunderts als Inhaltsstoff des Blutes bekannt. Der Begriff Serotonin wurde jedoch erst Ende der 1940er Jahre geprägt als konstringierende Substanz „tonic“, die im „Serum“ des Blutes enthalten ist (Rapport et al., 1948).

Serotonin ist ein biogenes Amin, welches in einer Vielzahl unterschiedlicher Organismen eine Rolle als Neurotransmitter spielt, wobei es eine der wichtigsten Transmittersubstanzen sowohl im zentralen- als auch im peripheren Nervensystem darstellt (Twarog and Page, 1953). Chemisch gehört Serotonin (5-Hydroxytryptamin (5-HT)) zur Gruppe der Indolamine bzw. Monoamine und besitzt die Summenformel $C_{10}H_{12}N_2O$. Es stellt ein Derivat der natürlich vorkommenden Aminosäure Tryptophan dar.

Die Wirkung von Serotonin wird über spezifische Rezeptoren, die Gruppe der Serotoninrezeptoren, vermittelt. Die Kopplung an diese Rezeptoren setzt eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang. Zu den wichtigsten Effekten, die hierüber vermittelt werden, gehört die Aktivierung oder Inhibierung von Ionenkanälen.

1.2 Serotoninrezeptoren

Serotoninrezeptoren sind eine wichtige Gruppe innerhalb der Familie der 7-Helix- Rezeptoren. Allgemein stellen Zell- bzw. Membranrezeptoren für jede Zelle die Verbindung zum Extrazellularraum dar. Durch Bindung extrazellulärer Botenstoffe an spezifische Membranrezeptoren werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, welche physiologische Effekte vermitteln. Für Serotoninrezeptoren ist Serotonin dieser Ligand, wobei eine Reihe weiterer

analoger Liganden existiert, die sich teilweise in ihrer Selektivität zu einzelnen Serotoninrezeptoren unterscheiden.

Serotoninrezeptoren gehören zur Rezeptorfamilie der 7- Helix- Rezeptoren, die an GTP- Proteine (G- Proteine) gekoppelt sind, weshalb sie als G- Protein gekoppelte Rezeptoren (G- Protein coupled receptors, GPCRs) bezeichnet werden (Kristiansen, 2004). Das heißt, sie sind an ein intrazellulär lokalisiertes G- Protein gekoppelt, welches die Effekte der Ligandenbindung in ein intrazelluläres Signal transduziert. Neben den GPCRs existieren vier weitere Kategorien an Rezeptoren: ligandenaktivierte Ionenkanäle, Tyrosinkinaserzeptoren, Zytokinrezeptoren und Guanylatzyklen (Löffler, 2005).

Serotoninrezeptoren konnten bisher nicht nur im Zentralnervensystem (ZNS) und im peripheren Nervensystem (PNS) nachgewiesen werden, sondern auch im Magen-/Darmtrakt und im kardiovaskulären System. Diese physiologische Vielfalt spiegelt die Bedeutung von Serotonin als Transmittersubstanz wider. Entsprechend weist die Familie der Serotoninrezeptoren eine große funktionelle und strukturelle Vielfalt auf, wobei sie mit Ausnahme des 5-HT₃ Rezeptors, der ein ligandengesteuerter Ionenkanal ist, alle zu den G- Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehören. Sie werden aktuell in sieben Gruppen 5-HT₁₋₇, mit insgesamt 14 Subtypen, eingeteilt (Hoyer et al., 1994). Bei einigen Subtypen ist dabei bisher weder die Funktion noch der Signaltransduktionsweg über ein entsprechendes G- Protein restlos geklärt.

In ihrer Struktur folgen die einzelnen Serotoninrezeptoren mit Ausnahme des Ionenkanals 5-HT₃ dem Schema der 7- Helix- Rezeptoren. Das bedeutet, sieben Domänen durchspannen die Zellmembran, jeweils verbunden mit einer Loopingstruktur, wobei Disulfidbrücken stabilisierend wirken (Ballesteros and Weinstein, 1994). Flankiert werden diese Transmembrandomänen vom extrazellulär gelegenen Aminoterminus und dem intrazellulär gelegenen Carboxylterminus (Abb. 1).

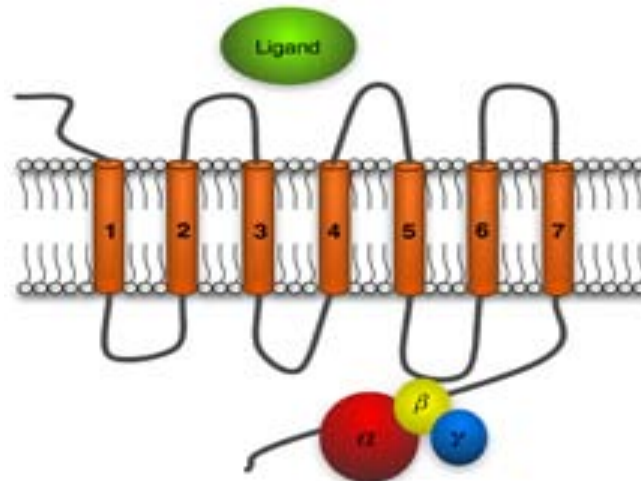


Abb. 1: Modell eines 7- Helix- Rezeptors

Schematische Darstellung des Aufbaus eines 7- Helix- Rezeptors in seiner Topografie zur Zellmembran. Charakteristisch ist die Anordnung von 7 transmembranären Domänen, die über intra- und extrazelluläre gelegene Loopingstrukturen miteinander verbunden sind. Der intrazellulär gelegene Carboxylterminus stellt die Verbindung zu einem spezifischen G- Protein dar. Die extrazellulären Domänen bilden spezifische Bindungstaschen für die Rezeptor – Liganden Interaktion aus. (aus (Krishnamurthy et al., 2006))

Über diesen intrazellulären Terminus sind die zur Signaltransduktion notwendigen G- Proteine mit dem 7- Helix- Rezeptor verbunden. Die G- Proteine selbst bestehen aus drei Untereinheiten α , β und γ , wobei an die α - Untereinheit in der inaktiven Form ein GDP gebunden ist. Die Aktivierung des GPCR führt zur Abgabe des GDP, woraufhin das Heterotrimer aus α , β und γ in eine β , γ - und eine α - Einheit dissoziiert, wobei letztere eine hohe Affinität zu GTP hat und dieses schließlich bindet. Das mit GTP beladene G- Protein aktiviert nun zelluläre Proteinfunktionen. Zur Inaktivierung des G- Proteins kommt es durch die hydrolytische Spaltung des GTP, die durch ein Enzym, die so genannte GTPase, katalysiert wird. Die Art der zellulären Effekte hängt wesentlich von dem Typ des G- Proteins ab: Es existieren vier spezifische Familien: G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, $G_{12/13}$ (Strathmann et al., 1989), wobei die Effekte sowohl über G_α als auch über $G_{\beta\gamma}$ vermittelt sein können. Bezogen auf die Serotoninrezeptoren wird postuliert, dass die Mitglieder der 5-HT_{1A} - Familie an ein $G_{i/o}$ - Protein koppeln, die Rezeptoren von 5-HT_4 , 5-HT_5 , 5-HT_6 und 5-HT_7 an ein G_s - Protein und 5-HT_{2C} an ein G_q - Protein (Hoyer et al., 1994).

Die wesentlichen Zielmoleküle der G_{α} - Untereinheit sind die Adenylatzyklase und die Phospholipase $C\beta$ (PLC- β), andere Zielstrukturen besitzen eine untergeordnete Rolle. G_s Proteine vermitteln über α_s die Aktivierung der Adenylatzyklase. $G_{i/o}$ - Proteine bewirken über $\alpha_{i/o}$ eine Inhibierung der Adenylatzyklase, über die $\beta\gamma_{i/o}$ - Untereinheit koppeln sie direkt an Effektormoleküle und aktivieren diese, was bspw. für Kir3- Kanäle aus der Familie der Kaliumkanäle zutrifft. Außerdem wirken sie aktivierend auf die PLC- β sowie hemmend auf N-,P- und Q-Typ Ca^{2+} - Kanäle (Clapham, 1997). $G_{\alpha q/11}$ - Proteine aktivieren die PLC- β , $G_{\alpha 12/13}$ - Proteine aktivieren den so genannten Guaninnukleotidaustauschfaktor der Rhodopsinkinase.

Die Adenylatzyklase bewirkt bei Aktivierung die Spaltung von ATP in zyklisches AMP, so genanntes cAMP. Dieses Molekül fungiert als „second messenger“ und aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die eine Reihe spezifischer Effekte auf den Zellmetabolismus hat. Die Hemmung der Adenylatzyklase bewirkt entsprechend das Absinken des cAMP- Wirkspiegels und die Hemmung der PKA. Die Signalkaskade der Phospholipase $C\beta$ ist komplexer: Sie bewirkt primär den Anstieg von zytosolischem Ca^{2+} , darüber hinaus katalysiert sie die Spaltung des Membranphospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu den second messenger Molekülen Inositol-1,4,5-triphosphat ($InsP_3$) und Diacylglycerin. In der Folge kommt es zum Ca^{2+} - Einstrom ins Zytosol durch Aktivierung eines Calciumkanals des *Endoplasmatischen Reticulums* sowie zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), die ähnlich der PKA den Zellstoffwechsel in vielfacher Weise beeinflusst.

1.2.1 5-HT_{1A} Rezeptor

Der 5-HT_{1A} Rezeptor war der erste Rezeptor aller Serotonin Rezeptoren, der als ein intronloser genomischer Klon des menschlichen Erbguts kloniert werden konnte (Kobilka et al., 1987). Er setzt sich aus 422 Aminosäuren zusammen, wobei seine Struktur jener der beschriebenen 7- Helix- Rezeptoren entspricht. Der 5-HT_{1A} Rezeptor ist an ein $G_{i/o}$ - Protein gekoppelt, so dass seine

Aktivierung primär die Hemmung der cAMP- Synthese bewirkt (α - Untereinheit). Außerdem besteht über die $\beta\gamma$ - Untereinheit eine direkte Verbindung zu K^+ - Kanälen der Kir- Familie (s.o.). Zudem konnten noch weitere Signalwege beschrieben werden, wie etwa die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) oder die Stimulation der „Stickstoffmonoxid Synthetase“ (NOS) (vgl. (Raymond et al., 2001). Das heißt der 5-HT_{1A} Rezeptor bewirkt nicht universell eine Inhibierung der Adenylatzyklase (Clarke et al., 1996). Für die Untersuchung des 5-HT_{1A} Rezeptors in Verbindung mit Kir- Kanälen spielen diese Signalwege jedoch eine untergeordnete Rolle, so dass sie nicht näher dargestellt werden.

Die Bindung des Liganden erfolgt an spezielle Bindungsstellen, taschenartigen Strukturen an den Transmembrandomänen, wobei folgende Aminosäuren in diesen Taschen identifiziert werden konnten (Ho et al., 1992), die anscheinend eine wichtige Rolle für die Bindung des Liganden spielen: Asp⁸², Asp¹¹⁶, Ser¹⁹⁹ und Ser³⁹³. Eine Disulfidbrücke zwischen Cys¹⁸⁷ und Cys¹⁰⁹ soll zudem die Konformation des Rezeptors stützen und die Bindung des Liganden modifizieren (Emerit et al., 1991). Die Bindung bewirkt ein Umschalten des inaktiven G- Proteins in die aktive Form, wobei dieses über die intrazellulären Loopingstrukturen i2 und i3 des 7- Helix- Rezeptors an diesen gebunden ist.

Als Ligand für den 5-HT_{1A} Rezeptor fungiert Serotonin (5-HT) als nicht selektiver Agonist, selektiv wirkt 8- OH- DPAT (8-hydroxy-2-(di-N-propylamino)tetralin), weitere Liganden sind beschrieben.

Die Bedeutung der Serotoninrezeptoren im Allgemeinen, insbesondere aber des 5-HT_{1A} Rezeptors, wird daran deutlich, in welchen biologischen Prozessen er eine Rolle spielt. Eine Schlüsselrolle scheint der 5-HT_{1A} Rezeptor für die Entstehung und Modulation einer Vielzahl unterschiedlicher kognitiver und das Verhalten betreffender Funktionen zu spielen wie Schlaf, Stimmung, Schmerz, Suchtverhalten, Bewegung, sexuelle Aktivität, Depression, Angst, Alkoholmissbrauch, Aggression und Lernverhalten (zitiert nach (Pucadyil et al., 2004)). Dies macht deutlich, dass 5-HT_{1A} Rezeptoren speziell im ZNS essentiell sind, wobei mittels radioaktiv markierter Liganden sowie mittels spezifischer Antikörper (Kung et al., 1994; Palacios et al., 1990) Verteilungsmuster des 5-HT_{1A} Rezeptors im Gehirn analysiert werden konnten. Die höchste Dichte des

Rezeptors konnte im *limbischen System*, besonders im *Hippocampus*, den *Raphé*- Kernen, der *Amygdala*, dem *Hypothalamus* sowie im *Cortex* nachgewiesen werden, was mit den Symptomen korreliert, die auftreten, wenn eine Störung des Serotoninsignalwegs vorliegt. In diesem Zusammenhang spielen psychische Erkrankungen eine wichtige Rolle wie Schizophrenie, Depressionen, Suizidales Verhalten, Autismus, daneben auch Migräne und Essstörungen (zitiert nach (Pucadyil et al., 2004)). Außerdem spielen serotonerge Signalwege eine ausschlaggebende Rolle bei der embryonalen bzw. fetalen Entwicklung des Gehirns (Gross et al., 2002) (Gaspar et al., 2003). Außerhalb des ZNS konnte der 5-HT_{1A} Rezeptor unter anderem in der Milz (Fargin et al., 1988), in embryonalen Nierenzellen, HEK 293 Zellen (Kirchgessner et al., 1993) (Albert et al., 1999) und im Magen-/Darmtrakt (Raymond et al., 1993) nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit liegt der Fokus auf den neuronalen 5-HT_{1A} Rezeptoren.

Die Betrachtung von Verteilungsmustern zeigt, dass 5-HT_{1A} Rezeptoren in neuronalem Gewebe sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert sein können (Miquel et al., 1992) (Radja et al., 1992), wobei die Eigenschaften der Signalübertragung variieren (Clarke et al., 1996). So konnte demonstriert werden, dass die Rezeptoraktivität von 5-HT_{1A} Rezeptoren variabel ist und keineswegs nach einem „alles oder nichts“ Prinzip funktioniert (Langlois et al., 1996), wie dies bspw. beim Aktionspotenzial einer erregbaren Zelle gegeben ist.

1.2.2 5-HT₇ Rezeptor

Der 5-HT₇ Rezeptor konnte erstmals 1993 isoliert werden (Bard et al., 1993), die menschliche Variante stellt ein Protein aus 445 Aminosäuren dar (Gelernter et al., 1995), wobei das Gen über zwei Intronregionen verfügt, so dass mehrere funktionsfähige Splicevarianten identifiziert werden konnten (Heidmann et al., 1997). Bei allen Varianten wird gegenwärtig der G_s- Signalweg angenommen, wobei auch die Möglichkeit der Kopplung an andere G- Proteine (Baker et al.,

1998), sowie die Aktivierung extrazellulärer signalregulierter Kinasen, MAP Kinasen ERK (Errico et al., 2001), diskutiert wird. Die Bindung des Liganden an den 5-HT₇ Rezeptor bewirkt eine Stimulation der Adenylatzyklase und damit einen Anstieg von cAMP. Eine direkte Kopplung des Rezeptors an ein Effektorprotein ist – anders als beim 5-HT_{1A} Rezeptor – nicht beschrieben. Die Kopplung des Rezeptors an das G- Protein geschieht analog zum 5-HT_{1A} Rezeptor über eine intrazelluläre Loopingstruktur (i3) (Obosi et al., 1997). Als Agonisten dienen Serotonin (5-HT), 5-Carboxamidotryptamin (5-CT) und andere Substanzen, wobei bisher kein selektiver 5-HT₇ Rezeptor- Agonist identifiziert werden konnte.

Der 5-HT₇ Rezeptor wird im ZNS hoch exprimiert, dabei vor allem in *Hippocampus*, *Hypothalamus* und *Neocortex*. Außerdem konnte er im *Nucleus suprachiasmaticus* nachgewiesen werden (Lovenberg et al., 1993), weshalb über eine Beteiligung an der zirkadianen Rhythmogenese spekuliert wird. Außerhalb des ZNS können 5-HT₇ Rezeptoren nachgewiesen werden in *Glia*-Zellen (Hirst et al., 1997) und in der Milz (Shen et al., 1993). Eine wichtige Rolle spielt ihre Expression in der glatten Muskulatur von Magen-/Darmtrakt (Eglen et al., 1997) und Blutgefäßen (Schoeffter et al., 1996).

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht die funktionelle Bedeutung von 5-HT₇ Rezeptoren im ZNS. Hier impliziert die 5-HT₇- Aktivierung die Inhibition der Amplitude der Ca²⁺- Spike induzierten langsamen Nachhyperpolarisierung in so genannten CA3 Neuronen des *Hippocampus* (vgl. (Raymond et al., 2001). Jedoch zeigen aktuelle Forschungen in diesem Bereich, dass die genauen Mechanismen der 5-HT₇ Wirkweise noch nicht endgültig geklärt sind, denn Chapin und Andrade (Chapin and Andrade, 2000) (Chapin and Andrade, 2001a, b) konnten nachweisen, dass 5-HT₇ Rezeptoren auch eine Stimulation der Nachhyperpolarisierung im *anterodorsalen Nucleus* des *Thalamus* bewirken können. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Nachdepolarisierung unabhängig von der PKA ist, so dass auch andere Signalwege als der G_s- Signalweg involviert sein müssen.

Entsprechend des Vorkommens im ZNS werden dem 5-HT₇ Rezeptor Funktionen im Bereich der Thermoregulation, des Gedächtnisses und

Lernverhaltens, des Schlafs und der Stimmung zugeschrieben (Hedlund and Sutcliffe, 2004).

1.2.3 Homo- und Heteromerisierung G- Protein gekoppelter Rezeptoren

Die Tatsache, dass Membranproteine zur Homo- und Heteromerisierung fähig sind, ist bereits bekannt. Bewiesen ist auch, dass die Bildung von Quartärstrukturen in vielen Fällen überhaupt die Grundlage für die Funktionsweise darstellt, wie an Kanalproteinen, bspw. den einwärts gleichrichtenden Kaliumkanälen (Kir- Kanäle), gezeigt werden konnte.

Dass jedoch auch G- Protein gekoppelte Rezeptoren als Homo- bzw. Heteromere existieren, wurde lange Zeit bezweifelt. Erst eine große Menge an Daten verschaffte dieser Theorie allgemeine Akzeptanz (Bouvier, 2001) (Kroeger et al., 2003) (Bai, 2004). Mittlerweile geht man davon aus, dass nicht einzelne sondern die meisten GPCR als Dimere existieren, außerdem legen neuere Daten nahe, dass die Dimerisierung bereits im Rahmen der Proteinbiosynthese im *Endoplasmatischen Retikulum* stattfindet (Terrillon et al., 2003). In diesem Zusammenhang wird postuliert, dass die Dimerisierung die obligate Voraussetzung für den Transport des Rezeptordimers aus dem *Endoplasmatischen Retikulum* in die Zellmembran darstellt (Salahpour et al., 2004).

Die biologische Funktion der Rezeptordimere konnte bisher nur teilweise geklärt werden. Für Homomere wird angenommen, dass sie in einem stöchiometrischen Verhältnis von 2:1 mit dem entsprechenden G- Protein vorliegen (Baneres and Parello, 2003) und erst die Aktivierung beider Ligandenbindungsstellen eine optimale Kopplung zum entsprechenden G- Protein ermöglicht (Kniazeff et al., 2004).

Bei der Heterodimerisierung werden zwei Formen unterschieden, die obligatorische Dimerisierung und die fakultative Dimerisierung. Erstere ist notwendig, um den Transport des Rezeptordimers vom *Endoplasmatischen*

Retikulum zur Zellmembran zu bewirken und um die Funktion des Rezeptors zu gewährleisten, wie bspw. für den GABA_B Rezeptor gezeigt werden konnte (Marshall et al., 1999b) (Marshall et al., 1999a).

In einigen Fällen konnte für die fakultative Heterodimerisierung bereits gezeigt werden, dass sich hieraus relevante phänotypische Veränderungen für den Rezeptor ergeben (Kroeger et al., 2003). Dies umfasst pharmakologische Eigenschaften, Veränderungen in der Kopplung an G- Proteine, die Signaltransduktion und Modifikationen in der GPCR Regulation und im Proteintransport (Kroeger et al., 2003) (Breit et al., 2004). Welche Konsequenzen sich hieraus für klinische Fragestellungen ergeben bzw. welche Rolle diese fakultative Heterodimerisierungen im Rahmen pathophysiologischer Prozesse spielen, ist bis dato nur in Ansätzen geklärt (Abdalla et al., 2001).

Auf molekularer Ebene hingegen existieren bereits Ansätze, welche die Strukturen der Kopplung identifizieren. Dabei konnte in Experimenten gezeigt werden, dass drei Strukturen die Bindung der Monomere vermitteln: Der N-Terminus, der C- Terminus und die α - Looping Strukturen der Transmembrandomänen. Die Bindung über den N- Terminus wird über Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten bewirkt (Ray et al., 1999). Die Verbindung über den C- Terminus scheint in erster Linie eine Rolle bei der Freisetzung der Dimere aus dem *Endoplasmatischen Retikulum* zu spielen (Margeta-Mitrovic et al., 2000), so dass der C- Terminus als essentielle Grenzstruktur für die Dimerisierung betrachtet wird. Die α - helikalen Strukturen der Transmembrandomänen stellen, basierend auf neuesten Forschungen, die wichtigste Verbindungszone für die Dimerisierung dar (Lee et al., 2003; Overton et al., 2003). Mittels Mutageneseanalysen konnte gezeigt werden (Gouldson et al., 2001), dass sich auf den externen Regionen der Transmembrandomänen korrespondierende Aminosäurereste befinden, welche die Homomerinteraktion vermitteln. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion in einer koordinierten Weise abläuft, so dass die Möglichkeiten der Dimerisierung kontrolliert und limitiert sind (Filizola et al., 2002). *In vivo* nachgewiesen werden konnten diese Erkenntnisse bisher bei zwei Opiatrezeptoren (Jordan and Devi, 1999), so dass viele Fragen zur Funktionsweise und molekularen Basis der

Heterodimerisierung von GPCR noch ungeklärt sind und damit ein aktuelles Forschungsgebiet darstellen.

1.3 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle bewerkstelligen den passiven Transport von K^+ - Ionen von einer Seite der Zellmembran auf die andere. Sie stellen die größte Gruppe von Ionenkanälen dar, wobei bisher über 75 Gene bekannt sind, die für Kaliumkanäle kodieren (Jenkinson, 2006). Mittels einer Röntgenstrukturanalyse des kristallisierten Kanalproteins gelang es, die Struktur und damit das Funktionsprinzip dieser Kanäle zu entschlüsseln (Doyle et al., 1998): Es handelt sich um Proteinkomplexe, die aus mehreren hydrophoben Untereinheiten (Tetramere) bestehen. Diese bilden in biologischen Membranen einen vollständig von Proteinabschnitten umgebenen Kanal aus. Die engste Stelle der Kanalpore bildet dabei einen Selektivitätsfilter, welcher aus der Aminosäuresequenz Glycin – Tyrosin – Glycin (Yellen et al., 1991) besteht und charakteristisch für die meisten Kaliumkanalproteine ist. Diese Struktur ersetzt die Hydrathülle der durchtretenden K^+ - Ionen, die Hülle anderer Ionen jedoch nicht (Schmidt et al., 2000). So diffundiert ausschließlich Kalium entlang des elektrochemischen Gradienten.

Die Bedeutung des Kaliums bzw. der Kaliumkanäle für die Zelle ist elementar, in vielen biologischen Prozessen spielt Kalium eine Schlüsselrolle, so auch für das Zellpotenzial und die Erregbarkeit der Zelle. Die Kaliumkonzentration differiert dabei zwischen unterschiedlichen Zelltypen; in neuronalen Säugerzellen beträgt sie in etwa 155 mM (Daten nach (Silbernagl and Despopoulos, 2007) und (Schmidt et al., 2000)).

Entsprechend struktureller Unterschiede in den Membrandomänen werden die Kaliumkanäle in drei große Gruppen eingeteilt (Gutman et al., 2003). Zum einen Kaliumkanäle, deren Untereinheiten aus sechs Transmembrandomänen sowie

einer Poren-Domäne bestehen (6TM/1P). Hierzu gehören die spannungsabhängigen (K_v) und die Na^+ -abhängigen (K_{Na}) Kaliumkanäle; die ursprünglich zu dieser Gruppe gerechneten Ca^{2+} -abhängigen (K_{Ca})-Kanäle werden mittlerweile separat eingeteilt.

Die zweite Untergruppe bilden die Kaliumkanäle, die aus Untereinheiten mit lediglich zwei Transmembrandomänen und einer Pore bestehen (2TM/1P). Hierunter verbirgt sich die Gruppe der einwärtsgleichrichtenden (K_{ir})- sowie die der ATP-sensitiven (K_{ATP})-Kaliumkanäle. Hier bilden jeweils vier Untereinheiten ein Homo- bzw. Heteromer, welches die Kanalpore formt.

Die dritte Gruppe der Säugetierkaliumkanäle stellen die so genannten Zwei-Poren Domänen Kaliumkanäle (K2P-Kanäle) dar. Ihre molekulare Struktur besteht aus je 4 Transmembrandomänen sowie zwei Porendomänen (4TM/2P) (Ilan and Goldstein, 2001). Wenngleich diese Gruppe erst 1995 entdeckt wurde, sind bisher über 50 codierende Gene für 4TM/2P Untereinheiten bekannt, wobei erst ein kleiner Teil erforscht ist (Goldstein et al., 2001). Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind sowohl die K_{ir} -Kanäle als auch die K2P-Kanäle.

Seit einigen Jahren ist zudem die Erkenntnis etabliert, dass verschiedene Kanäle der einzelnen Subfamilien in der Lage sind, Heteromere zu bilden, was sowohl für die Gruppe der K_{ir} -Kanäle gilt, als auch für die K2P-Kanäle. Für die K_{ir} -Kanäle konnte dies erstmals 1995 gezeigt werden (Krapivinsky et al., 1995). Im Herz und in vielen Regionen des Gehirns, wie etwa *Hippocampus*, *Bulbus olfactorius*, *Cortex*, *Thalamus* oder *Cerebellum*, konnten in der Folge Verteilungsmuster für das gleichzeitige Vorliegen unterschiedlicher K_{ir} -Subtypen nachgewiesen werden (Karschin et al., 1996). Für die K2P-Kanäle konnte dies am Heteromer der Kanäle TASK1/TASK3 nachgewiesen werden (Czirjak and Enyedi, 2002).

1.3.1 Tandem-Poren- Kaliumkanäle

Mit der Klonierung des Kaliumkanals TOK1 des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae* (Ketchum et al., 1995) gelang 1995 die Entdeckung einer völlig neuen Familie von Kaliumkanälen, die als charakteristisches Merkmal über zwei Porendomänen verfügen. Die erste Säugervariante der 2- Poren- Domänen Kaliumkanäle (K2P- Kanäle) wurde dann bereits 1996 identifiziert und erhielt den Namen TWIK-1 (Tandem of P domains in weak Inward rectifying K⁺ channel) (Lesage et al., 1996).

Die Familie der K2P- Kanäle umfasst bis heute 15 Mitglieder, die in sechs Subfamilien untergliedert sind, basierend auf Ähnlichkeiten in Sequenz, Struktur und Funktion: TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK und TRESK. Die aktuelle Terminologie richtet sich dabei nach den entsprechenden Genen KCNK 1-18 in Übereinstimmung mit der HUGO (Human Genomic Organisation) (Abb. 2).

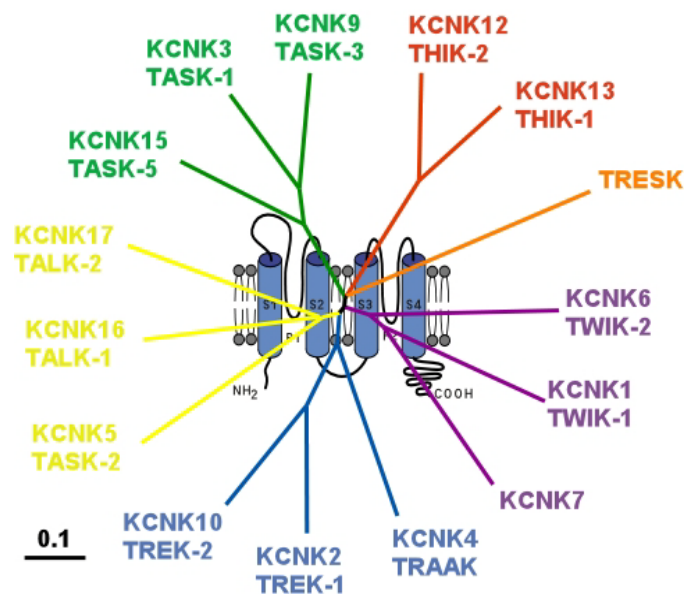


Abb. 2: Phylogenetischer Stammbaum der K2P- Kanäle

Phylogenetischer Stammbaum der zurzeit bekannten menschlichen K2P- Kanäle (Liu et al., 2004). Die 15 K2P- Kanäle der Säugetiere werden entsprechend ihrer Sequenzhomologien in sechs Untergruppen aufgeteilt. Einzelheiten siehe Text. (aus <http://www.ipmc.cnrs.fr/~duprat/2p/biomol.htm> vom 01.11.2010)

Strukturell bestehen die K2P- Kanäle aus 307 bis 543 Aminosäuren und zeigen jeweils ähnliche Strukturmerkmale: Ein kurzer zytosolischer NH₂- Terminus,

gefolgt von vier Transmembrandomänen (M1-M4), welche die beiden Porendomänen (P1 und P2) formen, und schließlich ein langer COOH-Terminus (Lesage et al., 1996) (Abb. 3).

Die M- Domänen sind über so genannte Linkersequenzen miteinander verbunden, wobei die Verbindungen zwischen M1-M2 und M3-M4 extrazellulär liegen und die Poren P1 bzw. P2 formen. Disulfidbrücken, die von Cysteinresten geformt werden, stärken die Bindung zwischen den Untereinheiten. Des Weiteren sind die K2P- Kanäle an vielfältige intrazelluläre Hilfsproteine gebunden sind, welche den Transport in die Membran sowie die funktionelle Expression vermitteln (Plant et al., 2005).

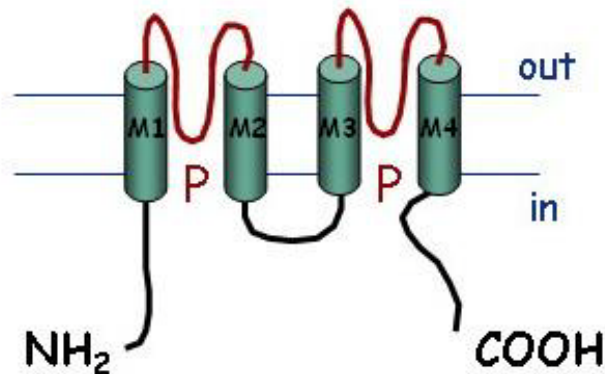


Abb. 3: Aufbau der K2P- Kanäle

Schematisch dargestellt ist die Membrantopologie eines K2P- Kanals. Die beiden porenbildenden Abschnitte P1 und P2 werden jeweils von zwei transmembranären α -helikalen Segmenten M1-M4 flankiert. (aus (Millar et al., 2007))

Die K2P- Kanäle erzeugen so genannte Hintergrundströme. Das heißt, auch in der unerregten Zelle sind K^+ - Leckströme zu messen, die eine essentielle Bedeutung für selbige haben: zum einen beeinflussen sie maßgeblich die Erregbarkeit der Zelle, indem sie Dauer, Frequenz und Amplitude des Aktionspotentials einer Zelle kontrollieren. Zum anderen stabilisieren sie das Ruhepotential, indem sie die Hyperpolarisation fördern (Hodgkin et al., 1952). Die Existenz dieser Ströme konnte bereits vor mehr als 50 Jahren nachgewiesen werden (Goldman, 1943) (Hodgkin et al., 1952), ihr molekulares

Korrelat in Form der K2P- Kanäle konnte jedoch erst 1995 entschlüsselt werden.

Die physiologischen Funktionen, die sich aus der Existenz der Hintergrundströme für unterschiedliche Gewebe und Organe ergeben, sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: **Physiologische Funktionen von K2P- Kanälen**

Chemozeption durch Neurone im <i>Glomus caroticum</i> , im Atemzentrum der <i>Medulla oblongata</i> u.a.
Neuroprotektion über Hyperpolarisation und verminderten Ca^{2+} - Einstrom im ZNS
Einstellung des Membranpotenzials und damit Einflussnahme auf prinzipiell alle Funktionen erregbarer Zellen
Über Rezeptorkopplung Beteiligung an neurohumeralen Steuerungsprozessen
Einfluss auf Herzkontraktilität über mechanosensitive Myokardiozyten
Geschmackswahrnehmung an Epithelzellen der Mundschleimhaut
Induktion der Aldosteronsynthese durch K^+ - sensitive Zellen

nach (Buckingham et al., 2005)

Das Verhalten der Hintergrundleitfähigkeit ist somit keineswegs starr, die Leckströme der Zelle müssen immer neu an veränderte Ionenkonzentrationen angepasst werden. Diese spezifischen Anforderungen spiegeln sich in den Eigenschaften der Kanäle wider: Sie sind fähig, makroskopische Ströme zu generieren, die ohne Verzögerung reagieren und dabei spannungsunabhängig sind (Goldstein et al., 1996). Das heißt, die Kanäle befinden sich auch am Ruhepotential der Zelle in einem aktiven, offenen Zustand und zeigen ein Verhalten, das als „Offene Gleichrichtung“ bezeichnet wird:

Zudem wurde herausgefunden, dass die K2P- Kanäle im Gegensatz zu allen anderen K^+ - Kanälen nicht durch klassische K^+ - Kanal- Blocker wie

Tetraethylammonium (TEA), 4-Aminopyridin (4-AP) oder Caesium (Cs^{2+}) gehemmt werden, wodurch sie sich von diesen klar unterscheiden (O'Connell et al., 2002).

Neben der Kontrolle durch die Ionenkonzentration unterliegen die K₂P- Kanäle einer Reihe weiterer physiologischer und pharmakologischer Faktoren, wobei hier Unterschiede zwischen den einzelnen Kanalsubfamilien zu beobachten sind. Als wichtigste Regulatoren sind zu nennen: pH- Wert, mechanischer Stress, Arachidonsäure, molekulareres CO₂ und O₂, lokale und volatile Anästhetika sowie Signalkaskaden über die Proteinkinasen A und C (PKA und PKC) (Kindler et al., 2000) (Lesage and Lazdunski, 2000) (Lesage, 2003).

1.3.1.1 **TASK Kanäle**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Mitglied der TASK Subfamilie (TWIK-related Acid Sensitive K⁺ - channel) verwendet: der TASK-1 Kanal. Charakteristisch ist die sensitive Reaktion auf die Änderung des extrazellulären pH- Wertes.

Beim Menschen konnte TASK-1 mRNA bisher in Pankreas, Plazenta, Hirn, Lunge und Herz nachgewiesen werden (Duprat et al., 1997).

In seinen physiologischen Eigenschaften folgt dieser Kanal den oben beschriebenen Merkmalen von K₂P- Kanälen. Es lässt sich unter physiologischen Bedingungen entsprechend der Goldman – Hodgkin – Katz – Gleichung ein spannungsunabhängiger Auswärtsstrom von Kalium beobachten (Duprat et al., 1997) (Leonoudakis et al., 1998). Charakteristisch für den TASK-1 Kanal ist neben der pH- Sensitivität die Empfindlichkeit für molekulares O₂, volatile Anästhetika und Anandamide (Maingret et al., 2001).

Die Auswahl dieses Kanals zum Zwecke der Charakterisierung von Serotoninrezeptoren, die im Rahmen der Arbeit vorgenommen werden sollte, erfolgte, weil der TASK-1 Kanal nicht nur gut mittels des pH- Wertes steuerbar ist, sondern auch Rezeptor vermittelt moduliert werden kann (Talley et al.,

2000). So konnte eine starke Inhibierung des TASK Stroms nachgewiesen werden bei der Kopplung einer Vielzahl von Hormon- und Neurotransmitterrezeptoren an heterotrimere G- Proteine der $G_{q/11}$ - Subfamilie (Lotshaw, 1997) (Talley et al., 2000). Im Gegensatz zum TASK-3 Kanal ist die rezeptorvermittelte Inhibierung des TASK-1 Kanal signifikant größer (Czirjak and Enyedi, 2002). Bemerkenswert ist jedoch, dass bisher nicht geklärt werden konnte, über welche Signalwege die Interaktion des Kanals mit den zur Signaltransduktion benötigten G- Proteinen funktioniert. Neben der Signaltransduktion durch $G_{q/11}$ - Proteine wird auch eine Beteiligung der α - Untereinheit des G_s - Signalwegs diskutiert, da die Aminosäuresequenz von TASK-1 multiple Phosphorylierungsstellen sowohl für die PKC (Target des $G_{q/11}$ - Signalwegs) als auch für die PKA (Target des G_s - Signalwegs) aufweist. Auch pharmakologische Manipulationen zur Aktivierung der beiden Kinasen konnten keine Erklärung des Signalweges liefern (Karschin et al., 2001).

1.3.2 Kir- Kanäle

Die Familie der Kir- Kanäle unterscheidet sich nicht nur strukturell von den K2P- Kanälen. Entscheidend ist die Richtung des Ionenflusses: Kir- Kanäle leiten die Kaliumionen bevorzugt von der extrazellulären auf die intrazelluläre Seite der Zellmembran, weshalb sie als einwärtsgerichtete K^+ - Kanäle (inwardly rectifying potassium channels) bezeichnet werden. Physiologisch bedeutsam ist aber ihr Kaliumauswärtsstrom zur Aufrechterhaltung des Membranruhepotenzials.

Die erste DNA von Untereinheiten der Kir- Kanäle konnte 1993 aus Nieren- und Herzzellen von Ratten sowie aus einer Makrophagenzelllinie kloniert werden (Dascal et al., 1993b). Mittlerweile sind 15 Kir Untereinheiten bekannt, die aktuell in sieben Subgruppen Kir1-7 gegliedert werden, wobei weitere Einteilungsschemata existieren (vgl. (Doupnik et al., 1995); (Fakler and Ruppersberg, 1996); (Isomoto et al., 1997)).

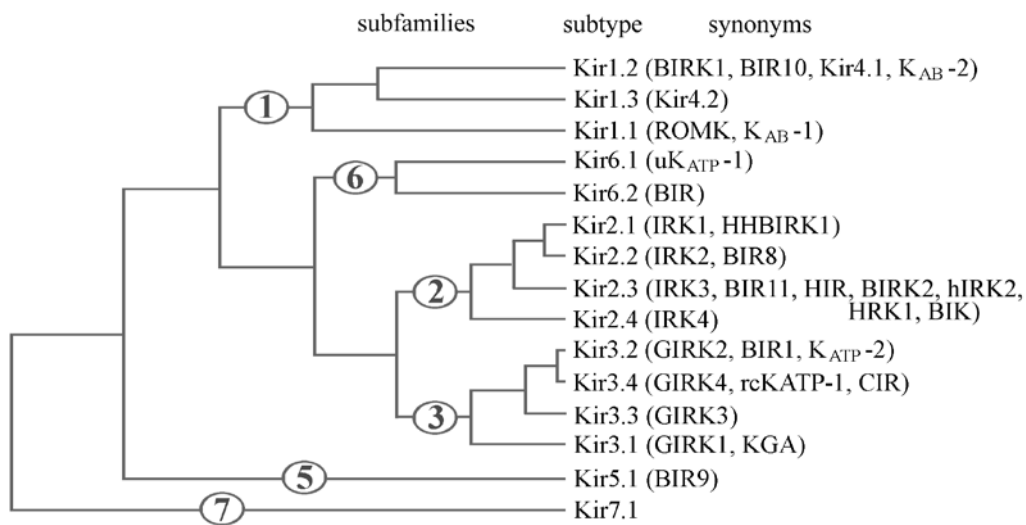


Abb. 4: Phylogenetischer Stammbaum der Kir- Kanäle

Dargestellt sind die bisher bekannten Kir- Kanäle der Säugetiere. Die Kir- Kanäle werden aktuell 7 Subfamilien zugeordnet. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Kanalheteromer GIRK 1/2 gehört zur Subfamilie der G- Protein gekoppelten Kir3- Kanäle. Einzelheiten sind im Text dargestellt. (aus (Isomoto et al., 1997))

Kir- Kanäle bestehen aus Proteinen, die sich aus 372 bis 501 Aminosäuren zusammensetzen. Der Aminoterminus liegt intrazellulär, woran sich die Sequenz für zwei membrandurchspannende Domänen, M1 und M2, anschließt, die eine Porenregion P, bezeichnet als H5, flankieren (Abb. 5).

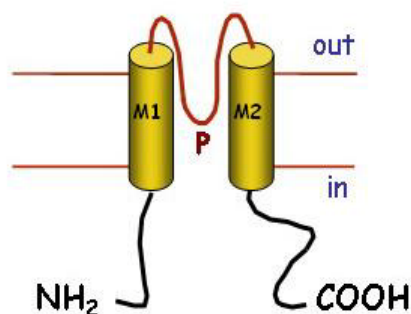


Abb. 5: Modell eines Kir- Kanals

Schematisch dargestellt ist der Aufbau einer Kir- Kanal Untereinheit mit der charakteristischen Anordnung einer Porenregion P, die von zwei transmembranären Domänen M1 und M2 flankiert wird. (aus (Millar et al., 2007))

Die Pore verfügt über den hoch konservierten Selektivitätsfilter (Pongs, 1993). Als langer Schwanz liegt das Carboxylende intrazellulär. Dass die einzelnen Kir- Untereinheiten *in vivo* nicht als Monomer vorliegen, konnte durch die Untersuchung des stöchiometrischen Verhältnisses an IRK1 bewiesen werden (Yang et al., 1995). Vier Untereinheiten bildeten den IRK- Kanal. Diese tetramere Struktur wurde auch für GIRK- Kanäle nachgewiesen (Inanobe et al., 1995). Die große Diversität an Kir- Kanälen beruht dabei auf der Fähigkeit, bei der Assemblierung der Untereinheiten nicht nur Homo- sondern auch Heteromere zu bilden (Krapivinsky et al., 1995). Dies konnte speziell bei der GIRK Subfamilie gezeigt werden (Wischmeyer et al., 1997). Für die Versuche mit GPCRs wurde im Rahmen dieser Arbeit auf ein Heteromer eines Kir- Kaliumkanals bestehend aus Kir3.1- und Kir3.2- Untereinheiten zurückgegriffen, genannt GIRK 1/2, da diese Kombination eine große Stromamplitude aufweist.

Die durch Kir- Kanäle generierten einwärtsgerichteten K^+ - Ströme wurden bereits 1949 elektrophysiologisch identifiziert durch Messungen an depolarisierten Skelettmuskeln (Katz, 1949). Ihr Entdecker Katz gebrauchte die Worte „anomalous rectification“, um die ungewöhnliche Richtung ihres Stromflusses zu beschreiben. Unter unphysiologischen Bedingungen ist dieser überwiegend einwärts, also in die Zelle gerichtet, unter den physiologischen Bedingungen einer hohen intra- und niedrigen extrazellulären Kaliumkonzentration ist der Strom auswärts gerichtet. Das heißt, die Funktion dieser Kanäle besteht darin, Kalium aus der Zelle heraus zu befördern. Das bedeutet, die Aktivierung der Kir- Kanäle hängt nicht nur vom Membranpotenzial ab, sondern auch vom Gleichgewichtspotenzial von K^+ (E_K). Die Kanalleitfähigkeit nimmt demnach zu, wenn die extrazelluläre K^+ - Konzentration zunimmt, was diesen Kanälen eine wichtige Rolle für die Regulation des Ruhe- und Aktionspotentials verschafft (Sakmann and Trube, 1984). Dementsprechend existieren diverse Regulationsmechanismen, welche die Einwärtsgleichrichtung gewährleisten. Diese Aspekte sind für die

vorliegende Arbeit jedoch von untergeordneter Bedeutung und sollen daher nicht ausgeführt werden.

Die Bedeutung der Kir- Kanäle ist äußerst divers und soll an zwei Beispielen ihrer der Pathophysiologie veranschaulicht werden: Kir1- Kanäle spielen in der Niere eine wichtige Rolle in der K^+ - Homöostase (Wang et al., 1992). Der genetische Defekt dieses K^+ - Kanals führt zu einer Störung der Ionengradienten innerhalb der Henle- Schleife, was letztlich zu einer insuffizienten Rückresorption von Natrium, und damit zu einem hyperreninämischen Hyperaldosteronismus führt. Dies wird als Bartter- Syndrom bezeichnet (Bartter et al., 1962).

Kir6.2- Kanäle werden im endokrinen Pankreas exprimiert und haben dort maßgeblich Einfluss auf die Regulation der β - Zellen, deren Insulinsekretion und die Architektur der Langerhansinseln. Entsprechend führt der Defekt dieser Kanäle zu einer gestörten Insulinsekretion und in der Folge zur Entwicklung eines Diabetes mellitus, dieser Defekt ist maßgeblich verantwortlich für den neonatalen Diabetes mellitus.

1.3.2.1 ***Kir3- Kanäle (GIRK- Kanäle)***

Genauer zu betrachten ist die Physiologie der Kir3- Kanäle als Gegenstand der Arbeit. Die charakteristische Eigenschaft der Kir3- Kanäle ist ihre Regulierung über G- Proteine, weshalb sie auch als GIRK (G- Protein coupled inwardly rectifying K⁺ channel) bezeichnet werden. Mit bisher fünf identifizierten Klonen stellen sie zudem die variantenreichste Subfamilie dar. Primär wurden sie aus atrialen Herzzellen kloniert (Kubo et al., 1993), wo gezeigt werden konnte, dass ein G- Protein- aktivierter Kir- Strom die Herzfrequenz reguliert (Dascal et al., 1993b). Mittlerweile konnten sie zudem aus dem Gehirn von Ratte (Lesage et al., 1994) und Mensch (Spauschus et al., 1996) isoliert werden und spielen dort erwiesenermaßen eine wichtige Rolle als Zielstruktur für G- Protein vermittelte Funktionen (Karschin et al., 1996; Karschin et al., 1994).

Durch heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von 7- Helix- Rezeptoren in der Lage ist, über G-Proteine die GIRK- Kanäle zu aktivieren. Nachgewiesen werden konnte dies für den muskarinischen M2- (Dascal et al., 1993a), den β 2- adrenergen- (Lim et al., 1995), den D2- Dopamin- (Brown et al., 1995), den A1- Adenosin- (Pfaff and Karschin, 1997), den μ - (Kovoor et al., 1995), κ - (Henry et al., 1995) und δ - Opiat- (Dascal et al., 1993b), den Cannabinoid- (Henry and Chavkin, 1995) den Melatonin- (Nelson et al., 1996), den GABA_B- (Sodickson and Bean, 1996) und schließlich für den Serotonin 1A (5-HT_{1A})- Rezeptor (Dascal et al., 1993a), welcher Gegenstand dieser Arbeit ist (Vgl. (Wischmeyer, 1997), S. 4f.).

Die Regulation der Kir- Kanäle über G- Proteine erfolgt mittels Liganden, meist Hormone oder Neurotransmitter, die an G- Protein gekoppelte Rezeptoren binden. Diese Aktivierung bewirkt eine postsynaptische Hyperpolarisation. Das heißt, die Aktivierung hat einen K⁺- Ausstrom zur Folge, was das Zellpotential negativer macht, die Erregbarkeit wird somit reduziert. Dabei wird die Kanalaktivität sowohl durch direkte Kopplung von G- Protein- Untereinheiten kontrolliert als auch durch Phosphorylierung über Kinasen (Karschin, 1999). Neuere Forschungen gehen von folgenden Mechanismen aus: Die Stimulierung des G- Proteins durch die Bindung eines Liganden an einen GPCR bewirkt die Dissoziation der G _{$\beta\gamma$} - Untereinheit von der G _{α} - Untereinheit, wobei die Aktivierung membrangebunden ausgeübt wird (Clapham, 1994) (Dascal, 1997). Ohne Aktivierung, also ohne die Anwesenheit eines G- Proteins, sind die Kanäle geschlossen, das heißt ihre basale Aktivität beträgt annähernd null. Die Fähigkeit, direkt an den Kir- Kanal zu binden, ist dabei der G _{$\beta\gamma$} - Untereinheit vorbehalten, hier ist also kein Second messenger involviert, was die Aktivierung um 2 Potenzen schneller macht (Karschin, 1999). Zwar ist auch die Inhibierung der Kir3- Kanäle durch G α beschrieben (Slesinger et al., 1995), doch scheint dieser Signalweg eine klar untergeordnete Rolle zu spielen.

Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass die G _{$\beta\gamma$} – Kir- Interaktion sowohl über den C- Terminus des Kanalproteins erfolgt (Huang et al., 1997) als auch über N- Terminus (Krapivinsky et al., 1998), wobei Na⁺ und Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) involviert sind (Karschin, 1999).

Die G- Protein – Kir- Interaktion wird darüber hinaus noch von so genannten RGS- Proteinen (regulators of G- Protein signaling) gesteuert. Sie gewährleisten die schnelle Inaktivierung der Kir- Kanäle. Dies konnte die vergleichende heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten zeigen, denn die Inaktivierung in GPCR – Kir- Systemen ohne diese Regulatorproteine erfolgte 50fach langsamer (Doupnik et al., 1997). In diesem Zusammenhang scheinen auch die G α - Untereinheiten eine wichtige Rolle zu spielen: Ihre Guanosin triphosphataseaktivität kann durch direkte Interaktion mit RGS- Proteinen gesteigert werden (Berman et al., 1996), das heißt die Dephosphorylierung von GTP zu GDP wird beschleunigt und damit die Aktivierung der G- Proteine beendet (Bünemann and Hosey, 1998).

1.4 Zielsetzung

Die zentrale Frage der Arbeit stellt die Untersuchung der Heterodimerisierung der beiden GPCRs 5-HT_{1A} und 5-HT₇ dar. Nachdem mithilfe eines Coimmunpräzipitationsverfahren (Kobe et al., 2008) der Nachweis erbracht werden konnte, dass die Heterodimerisierung *in vivo* existiert, soll geprüft werden, welche Effekte die heterodimere Expression der Rezeptoren auf die physiologischen Eigenschaften von Zellen besitzt und welche Unterschiede die Heterodimerisierung im Vergleich zur homomeren Expression der einzelnen Rezeptoren zeigt.

Basierend auf diesen Ergebnissen soll eine Charakterisierung des Heterodimers erfolgen, wobei zum einen verschiedene physiologische Parameter untersucht werden sollen und zum anderen molekulare Grundlagen der Effekte geprüft werden sollen.

Nachdem bisher nur wenige Daten zum Verhalten des 5-HT₇ Rezeptor existieren, soll dieser gesondert untersucht werden. Neben der Ermittlung von Dosis/Wirkungsbeziehungen soll der elektrophysiologische Vergleich mit einem

weiteren GPCR, dem β 1- Rezeptor, weitere Aufschlüsse bezüglich der Signaltransduktionsprozesse des 5-HT₇- Rezeptors liefern.

Für die Experimente wird auf *Xenopus laevis* Oozyten als Versuchsmodell zurückgegriffen, in denen die cRNA der jeweiligen Rezeptoren exprimiert wird. Anschließend werden mittels elektrophysiologischer und biochemischer Methoden sowie mithilfe von Biofluoreszenz verschiedene physiologische Eigenschaften und Parameter überprüft.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien wurden von den Herstellerfirmen Sigma Aldrich (Diesenhofen), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) in Analysequalität bezogen.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
3.5' Drummond Replacement Tubes	Drummond Scientific Company, USA
Einmal – Injektionskanüle	B. Braun Biotech, Melsungen
Elektroden GC200 F-15	Clark Electromedical Instruments, USA
Falcon – Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon – Röhrchen 10 ml, 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Immobilon-P Transfer Membran (PVDF)	Millipore, USA
Petrischalen	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
S.O.C. Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Zellkulturplatten	Nunc, Dänemark

2.1.3 Verwendete Geräte und Apparaturen

Gerät	Hersteller
<u>Autoklav</u>	
5075 ELC	Tuttnauer Systec, Wetttenberg
<u>Brutschränke</u>	
Brutschrank kalvitron t	Heraeus Instruments, Hanau
Hera cell 240	Heraeus Instruments, Hanau
Wärmeschrank WB 22	Mytron, Heiligenstadt
<u>DNA- Sequenzierer</u>	
ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
<u>Elektrophysiologie</u>	
Drummond Nanoject	Drummons Scientific Company, USA
L/M-3P-A	List Medical, Darmstadt
P-97 Flaming/Brown Micropipette	Sutter Instruments Co., USA
Puller	
Verstärker Turbo Tec-10cx	NPI Electronic Instruments, Tamm
<u>Heizblöcke</u>	
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Metallblock Thermostate	Thermo-Dux, Wertheim
<u>Mikroskope</u>	
Binokular Stemi SV 11	Zeiss, Göttingen
IX5 1	Olympus, Hamburg
Axiovert 35	Zeiss, Göttingen
LSM5 Pascal	Zeiss, Göttingen
Wild M5A	Wild Heerbrugg, Schweiz
<u>pH- Meter</u>	
pH- Meter CG 840	Schott, Jena
<u>Photometer</u>	
GeneQuant <i>pro</i>	Amersham, Freiburg
<u>Pipetten und Pipettierhilfen</u>	
Eppendorf Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipetus® - akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Schüttler

Schüttler/Brutschrank3032 GFL, Burgwedel

Spannungsgeräte

Electrophorese Power Supply EPS 301 Amersham, Freiburg

Power Pac 200 Bio-Rad, München

Stromversorger GPS 200/400 Pharmacia LKB, Freiburg

Thermocycler

Thermocycler Biometra, Göttingen

Zentrifugen

Biofuge fresco Heraeus Instruments, Hanau

Biofuge pico Heraeus Instruments, Hanau

PicoFuge® Microcentrifuge Stratagene, USA

Speed-Vac Connentrator SC110 Savant, USA

Zentrifuge J2-MC Beckman, Osterode

2.1.4 Rezepte für Nährmedien, Puffer und Gele

Als Lösungsmittel wurde doppelt entionisiertes Wasser (ddH₂O) aus der hauseigenen Anlage (Seralpur pro 90C, Seral, Ransbach) verwendet. Puffer und Lösungen gebrauchsfertiger Kits wurden nach den Instruktionen des Herstellers eingesetzt. Nährmedien und Lösungen für die Molekularbiologie wurden autoklaviert oder steril filtriert.

Nährmedien für *E.coli* und *Xenopus laevis* Oozyten

DMEM 4,5 g/l Glucose
 0,6 g/l L-Glutamin
 10 % fötales Rinderserum
 1 % Penicillin/ Streptomycin
 2 % HEPES

Inkubationslösung <i>X. laevis</i> Oozyten	96 mM NaCl 2 mM KCl 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 5 mM HEPES 2,5 mM Natriumpyruvat 100 µg/ml Gentamycin, pH 7,4
--	---

LB- Medium	20 g LB Broth Base ad 1 l ddH ₂ O
------------	---

LB- Platten	20 g LB Broth Base 15 g Agar ad 1 l ddH ₂ O
-------------	--

Agarose – Gelelektrophorese

DEPC-H ₂ O (0,1 %)	1 ml DEPC ad 1 l ddH ₂ O über Nacht rühren lassen
-------------------------------	--

MOPS (5x)	0,1 M MOPS, pH 7,0 40 mM Natriumacetat 5 mM EDTA, pH 8,0 ad 1 l DEPC-H ₂ O
-----------	--

Probenpuffer DNA (6x)	2,5 ml Bromphenolblau (1 %) 3 ml Glycerol ad 10 ml ddH ₂ O
-----------------------	---

Probenpuffer RNA	10 ml MOPS (5x) 8,5 ml Formaldehyd (37 %) 25 ml Formamid 2,5 ml Glycerol 0,1 mM EDTA, pH 8,0 1,25 ml Bromphenolblau 1 % ad 50 ml ddH ₂ O
Probenpuffer Xylencyanol (6x)	1 ml Xylencyanol (1 %) 3 ml Glycerin (99 %) 2,5 ml Bromphenolblau (1 %) ad 10 ml ddH ₂ O
TAE (50x)	2 M Tris 50 mM EDTA, pH 8,0 57,1 ml Eisessig (100 %) ad 1 l ddH ₂ O

Lösungen für elektrophysiologische Messungen an *Xenopus laevis* Oozyten

ND96 Lösung	96 mM NaCl 2 mM KCl 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 5 mM HEPES, pH 7,4
High Kalium (high K ⁺) Lösung	2 mM NaCl 96 mM KCl 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 5 mM HEPES, pH 7,4

Serotonin – Lösungen		entsprechend gewünschter Konzentration x µl Serotonin ad 20 ml high K ⁺
5-Carboxamidotryptamin Lösungen	(5-CT) –	entsprechend gewünschter Konzentration x µl 5-CT ad 20 ml ND96
Isoprenalin – Lösungen		entsprechend gewünschter Konzentration x µl Isoprenalin ad 20 ml ND96
Clozapin – Lösung		Verwendung einer 1 µM Lösung 2 µl Clozapin ad 20 ml ND96 aus 10 mM Stammlösung in DMSO

2.1.5 Reagenziensets (Kits)

Kit	Hersteller
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN [®] Plasmid MIDI Kit	QIAGEN, Hilden
RNeasy [®] MINI Kit	QIAGEN, Hilden

2.1.6 Biologische Materialien

E.coli – XL-1 Blue Zellen

Xenopus laevis Oozyten

2.1.7 Molekularbiologische Materialien

Antibiotika

Zur Amplifikation von Plasmid- DNA in *E.coli* wurden den Nährmedien Antibiotika zugesetzt, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten. Dabei betrug die Endkonzentration der Antibiotika 50 µg/ml. Die Resistenz für die jeweiligen Antibiotika wurde von den Plasmiden vermittelt. Die zuvor angesetzten Stammlösungen wiesen folgende Konzentrationen auf:

Ampicillin in ddH ₂ O	50 mg/ml
Kanamycin in ddH ₂ O	10 mg/ml
Tetrazyklin in 100 %igem Ethanol	5 mg/ml

Enzyme

Enzyme	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
DNase I	Roche, Mannheim
N- Glykosidase F	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen Typ II	New England Biolabs, Frankfurt
Pfu DNA- Polymerase	Stratagene, USA
Pfu Turbo DNA- Polymerase	Stratagene, USA
Proteaseinhibitor Complete, Mini	Roche, Mannheim
Protector RNase Inhibitor	Roche, Mannheim
T4- Ligase	Roche, Mannheim

T7 RNA- Polymerase	Roche, Mannheim
Taq DNA- Polymerase	QIAGEN, Hilden

Marker und Nukleotide

DNA- Marker	New England Biolabs, Frankfurt
20 µl ΦX174 DANN-Hae III Digest	
40 µl λ DANN-Hind III Digest	
100 µl TE-Puffer, pH 8,0	
40 µl Probenpuffer (6x)	
10 min bei 65°C	
M ⁷ G(5')ppp(5')G	Roche, Mannheim
Ribonukleotide	Roche, Mannheim
RNA- Marker ssRNA (500-9000 Basen)	New England Biolabs, Frankfurt

Plasmid- Vektor

In der vorliegenden Arbeit wurde der folgende Vektor eingesetzt:

pSGEM: Dieser für *Xenopus laevis* Oozyten verwendete Expressionsvektor (3118 bp) wurde vom pSGEM-3Z Vektor (2743 bp, Promega, Mannheim) abgeleitet. Er enthält flankierend zur Multiple Cloning Site untranslatierte Regionen des *Xenopus* β- Globingens sowie einen T7 und SP6 Promotor. Upstream des SP6 Promotors befinden sich vier Restriktionsstellen, die zur Vektorlinearisierung (Sph I, Pac I, Sfi I, Nhe I) verwendet werden können.

2.1.8 Computerprogramme

AxioVision Viewer 3.0 Zeiss, Zeiss, Oberkochen, Deutschland

ABI Prism™ Sequencing Analysis 3.0, Applied Biosystems
CellWorks 5.5.1, NPI Electronic Instruments
CorelDRAW Graphics®, Corel Corporation, Ottawa, Kanada
DNASTAR Lasergene 5.0, Seqman
GraphPad Prism 5.0, GraphPad Software
IgorPro 5.0, Wavemetrics, Portland, USA
ImageJ 1.37v, Open source, National Institutes of Health, USA
Office® 2004 (Excel, PowerPoint, Word), Microsoft Corporation, Seattle, USA
Pulse, PulseFit, HEKA Elektronik, Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland
Photoshop 7, Adobe Systems, San Jose, USA
SPSS 15.0 für Windows, SPSS® Inc. Chicago, USA

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Herstellung des GFP- GIRK 1/2 pSGEM- Klons

Um das Expressionsverhalten des GIRK 1/2 Kanals untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine fluoreszenzmarkierte Variante des Kanals hergestellt: GFP- GIRK 1/2.

Die Ausgangsprodukte stellten GIRK 1/2 pcDNA3, der mir freundlicherweise von Dr. F. Döring zur Verfügung gestellt wurde, und der Klon pEGFP in dem Vektor c1 dar. In mehreren Subklonierungsschritten wurden die beiden Klone gekoppelt und zur Expression in *Xenopus laevis* Oozyten in den Vektor pSGEM kloniert.

2.2.1.1 Restriktion der DNA- Fragmente

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische kurze DNA-Sequenzen erkennen und spalten können, so dass der DNA- Doppelstrang an spezifischen Stellen in Fragmente geschnitten wird. Je nach Art der

Endonuklease können die hydrolytisch gespaltenen Schnittstellen der Fragmente glatt oder kohäsiv sein.

Um die Eigenschaften der Restriktion zu charakterisieren, wurde vor der eigentlichen eine so genannte analytische Restriktion durchgeführt, bei der lediglich 2-3 µg der jeweiligen DNA eingesetzt wurde, zusammen mit den entsprechenden Puffern. Für den anschließenden Restriktionsansatz wurde die komplette DNA- Menge verwendet zusammen mit der entsprechenden Menge an Enzymen und Puffern, dieser Ansatz wurde zumeist für drei Stunden bei den empfohlenen Temperaturen (meist 37°C) geschnitten. Musste der Restriktionsverdau mit zwei verschiedenen Enzymen erfolgen, wurde meist ein Doppelverdau bei empfohlenen Puffern und Temperaturen durchgeführt. War ein solcher Parallelverdau aufgrund der Pufferbedingungen nicht möglich, wurde sequentiell verdaut.

Im Anschluss an die Restriktion von Vektoren erfolgte eine Dephosphorylierung der geschnittenen Fragmente. Hierzu wurde das Enzym alkalische Phosphatase verwendet (30 min bei 37°C). Dabei wurde die endständige 5'-Phosphatgruppe des linearisierten Vektors enzymatisch abgespalten, um eine intramolekulare Selbstligation von Vektorfragmenten im Restriktionsverdau zu verhindern. Direkt nach der Inkubationszeit wurden Proben mit DNA-Probenpuffer (6x) versetzt und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und so die Reaktion abgestoppt.

2.2.1.2 ***Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA***

Um die in der Restriktion entstandenen Vektorfragmente für die Klonierung zu gewinnen, wurde die so genannte DNA- Fragmentanalyse verwendet, die auf einer Agarose- Gelelektrophorese basiert. Bei dieser Technik werden im elektrischen Feld DNA- Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Es entstehen Banden, welche eine Aussage über die enthaltenen DNA- Fragmente sowie deren Menge zulassen.

Die Herstellung des Gels erfolgt durch Auflösen der Agarose in 40 ml TAE (1x) Puffer und anschließendem Aufkochen der Lösung. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wird die Lösung mit 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und in die entsprechende Gelvorrichtung gegossen. Nach Erhärten des Gels werden die mit DNA- Probenpuffer (6x) versetzten Proben auf das Gel geladen und für 1 Stunde bei 100 V in TAE (1x) elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Auftrennung erfolgte ja nach DNA- Größe in einem 0,8 bis 1,5 %igem Agarosegel. Spezielle DNA- Marker, die zusammen mit den Proben auf das Gel aufgetragen wurden, ermöglichen eine eindeutige Größenzuordnung der entstandenen Fragmentbanden.

Die Banden sind aufgrund der Interkalation mit Ethidiumbromid unter UV- Licht sichtbar und können so mithilfe einer Kamera dokumentiert werden. Bei präparativen Gelen werden die gewünschten Banden unter UV- Licht mittels Skalpell ausgeschnitten.

2.2.1.3 **Isolierung von DNA- Fragmenten aus Agarosegelen**

Um die DNA zurück zu gewinnen, die in dem präparativen Gel gebunden wurde, wurden die aus dem Gel ausgeschnittenen DNA- Fragmente mithilfe des „QIAquick® Gel Extraction Kit“ aufgereinigt. Hierbei wird der Gelblock, welcher die DNA enthält in einem geeigneten Puffer aufgelöst und auf eine spezielle Silikamembran appliziert, wo die DNA durch eine selektive Bindung haften bleibt und so von den restlichen Verunreinigungen getrennt wird. Nach einem Waschschrift kann die gebundene DNA von der Säule eluiert werden, indem die Salzkonzentration (Tris oder H₂O) herabgesetzt wird.

2.2.1.4 **Ligation**

Um den gewünschten Vektor mit dem zu inserierenden DNA- Fragment zusammenzufügen wurde eine Ligation durchgeführt. Hierzu wurde ein spezieller Ligationsansatz verwendet, wobei die Menge der verwendeten DNA-

Fragmente von ihrem Konzentrationsverhältnis abhängig war, das mithilfe einer analytischen Gelelektrophorese abgeschätzt werden konnte (zumeist im Verhältnis Vektor zu Insert 1:3 bis 1:4). Der Ligationsansatz enthielt neben Vektor und Insert den Ligationspuffer (10x) sowie 1 µl der T4 DNA- Ligase. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C im Thermoblock inkubiert. Zu jedem Ansatz erfolgte zusätzlich eine Kontrollligation, bei der kein Insert eingesetzt wurde, um Fehler in der Fragmentbindung bzw. eine fehlerhafte Dephosphorylierung auszuschließen.

2.2.1.5 **Transformation**

Die Transformation erfolgte mithilfe kompetenter *E.coli* Bakterienstämme, die für ihre Verwendung langsam aufgetaut wurden. Sobald eine trübe Suspension erkennbar war, wurde die Plasmid- DNA in Form des kompletten Ligationsansatzes (meist 20 µl) zu den *E.coli* Stämmen hinzu gegeben.

Nach einer Inkubation von mindestens 30 min auf Eis wurden die Zellen für 45 s bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Anschließend wurden die Zellen für eine Minute auf Eis gestellt und für die weitere Inkubation 400 µl LB- Medium zugesetzt. Bei 37°C wurden die Zellen im Schüttelbrutschrank (230 rpm) inkubiert. Im Anschluss wurde die gesamte Suspension auf Agarplatten gegeben, die mit dem zur Selektion benötigten Antibiotikum (Ampicillin oder Vancomycin) versehen waren. Es folgte die Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht.

Von den beimpften Agarplatten wurden einzelne Bakterienkolonien der Ligation in 4 ml LB- Medium, das mit 20 µl des zur Selektion benötigten Antibiotikums versetzt wurde, angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden dann im Schüttelinkubator (230 rpm) bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.1.6 **Präparation von Plasmid- DNA aus 4 ml Bakterienkultur - MINI**

Die Isolation der Plasmid- DNA der *E.coli* Flüssigkulturen erfolgte anhand des „QIAquick® Spin Miniprep Kit“ Protokolls. Hierbei werden die Bakterien unter alkalischen Bedingungen lysiert und anschließend die Plasmid- DNA selektiv in der Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen an eine aus Silika- Gel bestehende Säule gebunden. Um Proteine, RNA und andere Verunreinigungen abzutrennen, werden mehrere Waschungen mit unterschiedlichen Puffern durchgeführt; die an die Säule gebundene Plasmid- DNA wird letztlich mittels 10 mM Tris-Cl (pH 8,5) Puffer eluiert. Die Konzentration der gewonnenen Plasmid- DNA wurde abschließend photometrisch im UV- Absorptionsbereich bei 260 und 280 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Die Reinheit der DNA lässt sich über den Quotienten OD_{260}/OD_{280} ermitteln, wobei der Wert reiner DNA zwischen 1,8 – 2,0 liegt.

Zusätzlich wurde eine Restriktionskontrolle durchgeführt, die verifizieren sollte, dass bei der Transformation das gewünschte Fragment im jeweiligen Vektor integriert wurde, so dass das gewünschte Produkt entstanden ist. Diese Kontrolle wurde mittels geeigneter Restriktionsenzyme durchgeführt. Die Proben wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mithilfe der Agarose- Gelelektrophorese analysiert. Anhand der Banden im Gel konnte das gewünschte Ergebnis geprüft werden.

2.2.1.7 **Präparation von Plasmid- DNA aus 50 ml Bakterienkulturen - MIDI**

Zur Gewinnung größerer und qualitativ hochwertiger Plasmid- DNA Mengen des gewünschten Konstrukts wurde nun das „QIAgen® Plasmid Midi Kit“ verwendet. Hierbei wurde von einer LB- Agar Platte eine 3 ml LB- Medium Vorkultur angeimpft und für ca. acht Stunden bei 37°C unter Schütteln (230 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 500 µl der Vorkultur in die 50 ml LB- Medium Arbeitskultur überbracht und bei 37°C über Nacht in den

Schüttelinkubator eingestellt. Die LB- Medien waren dabei jeweils mit dem zur Selektion benötigten Antibiotikum versehen.

Das zugrunde liegende Prinzip der Aufreinigung entspricht dem des „QIAquick® Spin Miniprep Kit“ Protokolls, wobei entsprechend größere Mengen in das Kit eingebracht wurden und somit auch größere Mengen an DNA gewonnen werden konnten. Entsprechend wurden 500 µl der Vorkultur in die 50 ml LB-Medium Arbeitskultur eingebracht und bei 37°C über Nacht im Schüttelbrutschrank (230 rpm) inkubiert.

Der fertige „Midi“- Ansatz wurde abschließend photometrisch und per Restriktionskontrolle überprüft und bildete die Grundlage für die anschließende *in vitro* Transkription.

2.2.1.8 **RNA- Synthese durch in vitro Transkription**

Die DNA des entstandenen Klons GFP – GIRK 1/2 pSGEM sollte im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten verwendet werden, weshalb DNA in eine translatierbare Form, cRNA, überführt werden musste.

Der Expressionsvektor pSGEM wurde zunächst für den Umschrieb linearisiert, wobei der Vektor downstream der zu transkribierenden Sequenz geschnitten wurde. Für diese Restriktion wurden 10-15 µg Matrizen- DNA und 40 U des entsprechenden Restriktionsenzym eingesetzt. Dieser Ansatz wurde bei 37°C für drei Stunden geschnitten, anschließend wurde mittels einer Agarose-Gelelektrophorese die Restriktion überprüft.

Um einen hohen Reinheitsgrad der zu transkribierenden DNA zu gewährleisten, wurde eine Reinigung der DNA in Form einer Phenol/Chloroform- Extraktion vorgenommen. Bei der anschließenden Fällung bei -20°C über Nacht wurde 1/10 Volumen von 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5- fachen Volumen von eiskaltem 100 %igem Ethanol eingesetzt. Die gefällte DNA wurde am folgenden Tag für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nachdem das Pellet mittels dem Speed-Vac Concentrator SC 110 getrocknet wurde, konnte die DNA in 25 µl

DEPC-H₂O resuspendiert werden. Die genaue DNA- Konzentration wurde durch eine photometrische Messung bestimmt, so dass 3 µg der Matrizen- DNA für die anschließende Transkriptionsreaktion eingesetzt werden konnten. Der Transkriptionsansatz wurde wie folgt zusammengestellt:

<u>Transkriptionsansatz</u>	
Matrizen- DNA (3 µg)	x
DEPC-H ₂ O	(20 – x) µl
ATP (10 mM)	5 µl
CTP (10 mM)	5 µl
UTP (10 mM)	5 µl
GTP+m7G(5')ppp(5')G-cap	5 µl
Transkriptionspuffer	5 µl
RNAse- Inhibitor	2,5 µl
T7 RNA-Polymerase	2,5 µl

Die Effizienz der Proteinexpression wurde entscheidend durch die Verwendung des GTP Cap Analogons GTP+m7G(5')ppp(5')G modifiziert, da dieses die Degradierung der mRNA in den Oozyten verhindert und somit die Translationsrate der mRNA Produkte steigert.

Der Ansatz der *in vitro* Transkription wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl DNase zudem Ansatz zugegeben, um den Abbau der Matrizen- DNA zu katalysieren (15 Minuten bei 37°C).

Die nun entstandene RNA wurde mittels Phenol/Chloroform- Extraktion und Fällung aufgereinigt. Der Fällungsansatz wurde wiederum über Nacht bei -20°C inkubiert, dann 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Mittels der Speed-Vac wurde das Pellet vollständig getrocknet und anschließend in 10 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

Abschließend wurde eine Konzentrationskontrolle vorgenommen. Dies geschah mit Hilfe eines speziellen RNA- Agarosegels. Für dieses Gel wurden 0,6 g Agarose abgewogen und mit 30 ml ddH₂O aufgefüllt. Nach kurzem Aufkochen und Abkühlen auf ungefähr 60°C wurden 8 ml MOPS (5x) und 7 ml Formaldehyd (37 %ig) hinzugegeben und in eine entsprechende Elektrophoreseform ausgegossen.

Der RNA- Probenpuffer wurde mit 1 µl Ethidiumbromid versetzt und jeweils 8 µl zu der Probe hinzugefügt. Um die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern, wurde die Probe für 10 Minuten bei 65°C erhitzt. Als Laufpuffer diente MOPS (1x), die Elektrophorese wurde bei 80 V für eine Stunde durchgeführt und unter UV-Licht fotodokumentiert.

Das geschilderte Protokoll der *in vitro* Transkription kam im Zuge der Arbeit nicht nur bei dem Klon GFP- GIRK 1/2 pSGEM zum Einsatz. Der mengenmäßig große Einsatz von cRNA zur Expression in *Xenopus laevis* Oozyten in Verbindung mit elektrophysiologischen Messungen machte eine Transkription für eine Reihe weiterer verwendeter Rezeptor- und Kanal- cRNA notwendig. Das Verfahren glich dem beschriebenen, einzig die Menge der eingesetzten Matrizen- DNA in den Transkriptionsansatz differierte teilweise. Im Folgenden sind die Klone aufgeführt, bei denen eine *in vitro* Transkription durchgeführt wurde:

Rezeptor-/ Kanal- Klon

5-HT 1A- Rezeptor

5-HT 2C- Rezeptor

5-HT 7- Rezeptor

Histamin 1- Rezeptor

Bradykinin 1- Rezeptor

β1- Rezeptor

TASK 1- Kanal

GIRK 1/2- Kanal

2.2.1.9 Sequenzierung von DNA

Die genaue Nukleotidsequenz der Klone wurde mit dem hauseigenen Sequenzierer ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer (APPLIED Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland) nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode überprüft (Verfahren nach (Sanger et al., 1977)).

Bei dieser Methode entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, da es durch den Einbau der Fluoreszenz markierten Dideoxynukleotide (ddNTPs) aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe zu einem Abbruch der DNA-Synthese kommt. Jede der vier Basen weist ein unterschiedliches Emissionsspektrum auf. Während der Kapillarelektrophorese werden die ddNTPs mittels Argonlaser angeregt und die jeweilige Emission detektiert.

Unter Verwendung des „Big Dye® Terminator v1.1 Kit“ wurde folgender PCR-Ansatz erstellt:

PCR- Ansatz

Matrizen- DNA (300 ng)	x µl
Primer (1 pmol/µl)	3 µl
Big Dye® Terminator Mix	2 µl
Sequenzierungspuffer (5x)	4 µl
mit ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 20 µl auffüllen	

Nach Beendigung der PCR wurden die Proben gefällt, aufgereinigt und für die Sequenzierung vorbereitet. Im Anschluss wurden alle Proben automatisiert in eine Gelkapillare gezogen und der Sequenziervorgang gestartet. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte über die spezielle Software „ABI Prism™ Sequencing Analysis 3.0“.

2.2.1.10 **RNA- Aufreinigung und Quantifizierung**

Um die über die *in vitro* Transkription gewonnene RNA quantifizieren zu können, wurde das „RNeasy[®] Mini Kit“ angewendet. Unter Anwendung dieses Protokolls wurde die RNA in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen und mit den mitgelieferten Puffern versetzt. Die Mischung wurde auf eine spezielle RNA-Säule gegeben, so dass die RNA an die RNeasy[®] Silica- Gelmembran binden konnte. Nachdem Kontaminationen wie Nukleotide durch Waschschriffe entfernt wurden, konnte die reine RNA in DEPC-H₂O eluiert werden.

Die Quantifizierung der gewonnen RNA erfolgte photometrisch im UV-Absorptionsbereich bei 260 und 280 nm in einer Quarzküvette. Die Reinheit der RNA ergibt sich aus dem Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀.

2.2.2 Fluoreszenzmessungen

2.2.2.1 **Fluoreszenzdarstellung mittels eines Laser Scanning Mikroskop**

Zur Darstellung von Fluoreszenz wurde ein konfokales Laser Scanning Mikroskop (LSM 5 Pascal, ZEISS, Göttingen, Deutschland) verwendet.

Diese Variante eines Lichtmikroskops verfügt über die Möglichkeit, optische Schnitte in räumlich ausgedehnten Objekten zu erzeugen. Durch spezielle Software können dann mittels Computer räumliche Darstellung zusammengesetzt werden.

Mittels des LSM können auch Fluoreszenz- markierte Strukturen sichtbar gemacht werden, so dass es zur Untersuchung der Fluoreszenz von pEGFP in GIRK 1/2 im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

pEGFP ist ein grün fluoreszierender Marker, dessen Anregungsmaximum bei ca. 489 nm liegt, so dass die exzitatorische Wellenlänge des Argonlasers auf 488 nm festgelegt wurde. Die Emissionswellenlänge, die analysiert wurde,

betrug 505 nm. Als Objektiv wurde ein 10x Plan- Neofluar verwendet, welches aufgrund der geringen Eigenfluoreszenz gut für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet ist.

2.2.2.2 *Fluoreszenzmessung an *Xenopus laevis* Oozyten*

Die Messung der *Xenopus laevis* Oozyten erfolgte nach folgendem Schema: Zunächst wurden einzelne Oozyten auf ein Deckglas gelegt und in einer geeigneten Ebene, die idealerweise dem Äquator der Oozyten entsprach, vermessen. In dieser Ebene konnte die Fluoreszenz der Oozytenmembran am besten beurteilt werden.

Um einen direkten Vergleich zwischen den fluoreszenzmarkierten Proben und den entsprechenden Negativkontrollen zu ermöglichen, wurden die Oozyten zusammen auf ein Deckglas gebracht und parallel vermessen, um Messfehler zu minimieren.

2.2.2.3 *Statistische Auswertung der Fluoreszenzmessungen*

Die Auswertung der digital aufgezeichneten Fluoreszenzmessungen erfolgte mithilfe der Programme CorelDraw (CorelDRAW Graphics[®], Corel Corporation, Ottawa, Kanada) und ImageJ. Die Aufzeichnungen wurden zunächst mit dem Programm Axiovision (AxioVision Viewer 3.0 Zeiss, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) in ein gängiges Grafikformat (JPEG) konvertiert. Mittels CorelDraw konnten die einzelnen Farbkanäle dann separat angezeigt werden, so dass die gemessene Grünfluoreszenz der GFP- Oozyten extrahiert werden konnte. Anschließend wurden Messfilter (Image J) über die Auswertungen der einzelnen Oozyten gelegt, um die Leuchtintensität der Oozyten objektiv zu quantifizieren. Die hieraus gewonnenen Daten wurden anschließend mittels des Kolmogorov- Smirnov- Tests auf ihre Normalverteilung überprüft und mit dem Programm Excel statistisch ausgewertet.

2.2.3 Präparation der *Xenopus laevis* Oozyten für elektrophysiologische Messungen

Die Untersuchungen von Ionenkanälen und ihrer Kopplung an verschiedene Rezeptoren wurde mittels der Zwei – Elektroden – Spannungsklemme (TEVC) an den Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* durchgeführt. Diese Technik hat sich seit längerem etabliert für Experimente an Ionenkanälen, Rezeptoren und Transportern und stellte somit auch für diese Arbeit das geeignete Messsystem dar.

Heterologe Expression bezeichnet die Expression von Genen bzw. Proteinen einer Spezies in einem Fremdorganismus. Das Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten eignet sich hierfür aus mehreren Gründen. Die Oozyten sind durch ihre Größe von etwa 1,0 – 1,5 mm leicht zugänglich und gut zu handhaben, auch ihre Gewinnung stellt kein Problem dar, sie werden dem weiblichen *Xenopus laevis* operativ entnommen. Des Weiteren besitzen die Oozyten eine hohe Translationsfähigkeit und führen die meisten posttranslationalen Modifikationen an fremden Proteinen sowie deren Einbau in die Zellmembran durch. Schließlich ist ihre Eigenerzeugung von relevanten Zellströmen relativ gering, so dass diese keinen Störfaktor für die elektrophysiologischen Messungen darstellen.

Nach der Gewinnung der Oozyten mittels operativer Entnahme wurden die Oozyten präpariert und für die RNA- Injektion vorbereitet. Hierzu wurden Oozyten der Reifestadien V und VI ausgewählt (Dumont, 1972).

Die Injektion erfolgte mithilfe eines stereomikroskopisch gesteuerten Injektors, wobei die cRNA durch die Mikroinjektionpumpe Drummond Nanoject in die Oozyten injiziert wurde (Abb. 6).

Nachdem die Injektionskapillaren mithilfe des Mikropipetten Pullers P-97 Flaming/Brown automatisch gezogen wurden, wurde ihre Spitze auf einen Außendurchmesser von ca. 2-5 μm abgeschnitten. Die Kapillaren wurden

zunächst mit Mineralöl luftblasenfrei gefüllt, anschließend wurde die cRNA eingefüllt. Es wurde die definierte Menge von 32,2 nl in jede Oozyte injiziert.

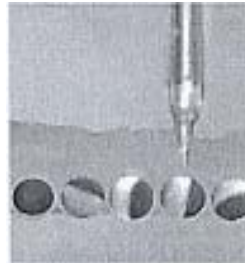


Abb. 6: Präparation der *Xenopus laevis* Oozyten

Oozyten von *Xenopus laevis* im Reifestadium IV-VI, während der Injektion der cRNA. (aus: „Untersuchungen zur Interaktion des Inhalationsanästhetikums Halothan mit K⁺-Kanälen mit zwei Porendomänen“, Öhrlein, K., 2006)

Nach der Injektion wurden die Oozyten in die Inkubationslösung bei 19°C im Brutschrank inkubiert. Die Expression dauerte bei den verwendeten Kanal- und Rezeptorproteinen durchschnittlich 48 Stunden.

2.2.4 Elektrophysiologische Methoden

2.2.4.1 Ganzzelleableitungen mittels der Zwei – Elektroden – Spannungsklemme (TEVC)

Die Methode der Spannungsklemme, das so genannte *Voltage clamp* Verfahren, dient dazu, Ströme und die Leitfähigkeit an Membranen erregbarer Zellen zu messen.

Voltage clamp Messungen erfolgen mittels zweier intrazellulärer Elektroden. Die Aufgabe der einen Elektrode besteht darin, das Membranpotenzial der Oozyte zu messen, hierzu ist sie mit einer zusätzliche Referenzelektrode verbunden, die sich in der Badlösung befindet. Die andere Elektrode dient dazu, Strom in die Oozyte zu applizieren, um Änderungen des Membranpotenzials der gemessenen Zelle zu verhindern. Dabei wird das Membranpotenzial der Zelle

vor der Messung auf einen gewünschten Wert eingestellt (geklemmt). Dieser Kompensationsstrom ist genauso groß wie der Strom, der durch die Membran fließt, ist diesem aber entgegengesetzt.

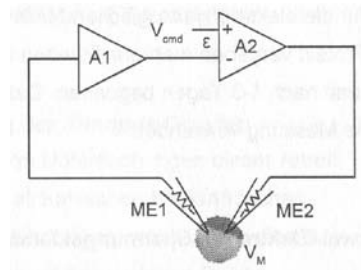


Abb. 7: Methode der Zwei-Elektroden- Spannungsklemme

Das Membranpotenzial (V_M) wird über den Verstärker A1 aufgenommen, der mit der Spannungsmikroelektrode ME1 verbunden ist. V_M wird im Rückkopplungsverstärker A2 mit dem vorgegebenen Haltepotenzial (V_{cmd}) verglichen. Der Output von A2 ist proportional zur Differenz ϵ zwischen V_M und V_{cmd} . (TEVC, modifiziert nach *The Axon Guide for Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques*, S.45)

Der hierbei fließende Strom dient als Messgröße und wird durch ein Verstärkersystem aufgenommen. Somit ist der Kompensationsstrom ein direktes Indiz für die Ionenbewegung bzw. die Leitfähigkeit über der Membran. Mithilfe eines Rückkopplungsverstärkers kann der benötigte Strom nachgeregelt und an die Änderungen der Membranleitfähigkeit angepasst werden, so dass sehr stabile Messungen bis zu Stunden möglich sind.

2.2.4.2 **Aufbau des Messstandes**

Die Grundausstattung des *Voltage Clamp* Messplatzes, der für die elektrophysiologischen Messungen der vorliegenden Arbeit benutzt wurde, setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: Ein Inversmikroskop (Axiovert 35, ZEISS, Oberkochen, Deutschland) zur Betrachtung der Oozyten, zwei Mikromanipulatoren, mit denen die beiden Elektroden in die Zellen eingestochen wurden, einen Zwei- Elektroden- Spannungsklemmenverstärker (Turbo Tec- 10C, NPI Electronic, Tamm, Deutschland), einen Pulsgenerator

sowie einen Messcomputer (MacOS, Apple Computer Inc., Cupertino, USA), mit entsprechender Messsoftware (Pulse & Pulse fit v.8.53, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland), um die gemessenen Rohdaten digitalisiert aufzuzeichnen.

Mit dem EPC9- gesteuerten Verstärker (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) konnten über der Oozytenmembran Ströme im Bereich von 0,2 – 30 μA gemessen werden.

Zusätzlich stand das Messsetup auf einem schwingungsgedämpften Tisch, der sich inmitten eines Faraday'schen- Käfigs befand, um äußere Einflüsse mechanischer oder elektrischer Art zu minimieren. Die Oozyten selbst wurden in die Messkammer des Inversmikroskops in Fokusebene eingebracht. Die Kammer verfügte über zwei Vertiefungen, eine für die Oozyte selbst, um ein Abgleiten während der Messung zu verhindern, die andere für die Referenzelektrode. Die Messkammer wurde während der gesamten Messung von Badlösung ausgefüllt. Hierzu existierte ein Zuleitsystem, welches einen kontinuierlichen Fluss gewährleistete, über ein Perfusorsystem konnten unterschiedliche Lösungen eingewaschen werden. Als Vorratsbehälter dienten 35 ml Spritzen, deren Zulauf über einen Drei-Wege Hahn reguliert wurde. Über das Pumpsystem MPCU-3 (LORENZ Elektronik, Lindau, Deutschland) wurden die Lösungen wieder abgesaugt.

2.2.4.3 **Messelektroden**

Bei den Elektroden, die für *Voltage Clamp* Messungen verwendet wurden, handelte es sich um chlorierte Silberelektroden aus Borosilikat mit Filament (HARVARD APARATUS, Kent, UK). Diese wurden mit einem Puller (L/M-3P-A, LIST MEDICAL, Darmstadt, Deutschland) in zwei Stufen gezogen, so dass der Außendurchmesser der Elektrodenspitze zwischen 1,0 – 3,0 μm betrug. Anschließend wurden die Spitzen der Elektroden mittels eines Drahtes unter einem Mikroskop abgebrochen. Nach luftblasenfreier Befüllung mit 3 M KCl

wurden die Elektroden über einen entsprechenden Elektrodenhalter mit chloriertem Silberdraht an den beiden Mikromanipulatoren gesteckt und in die Badlösung eingetaucht. Hierbei sollten die Elektroden einen Widerstand von 0,5 – 2,5 M Ω besitzen, wobei ein Strom- und Spannungsabgleich erfolgte. Die Elektroden konnten jeweils für mehrere Messungen verwendet werden.

2.2.4.4 **Messprotokolle**

Für die Messungen wurde das Programm Pulse & Pulse fit (HEKA) verwendet. Dieses ermöglicht es, die elektrophysiologischen Ströme, die über den Verstärker aufgenommen werden, graphisch darzustellen. Außerdem verfügt das Programm über verschiedene Messprotokolle, so dass die Messungen hierüber gesteuert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Protokolle verwendet: Spannungsrampen, Spannungssprünge, sog. „Many Jump“ sowie Langzeitmessungen.

Generell gilt bei allen verwendeten Protokollen, dass der auswärts gerichtete Strom mit positivem, der einwärts gerichtete Strom mit negativem Vorzeichen versehen wurde. Zu Beginn der Versuche wurde über das Programm der Wert des Klemmpotenzials eingestellt. Dieses wurde stets auf -70 mV eingestellt, was in etwa dem Membranpotenzial nativer Oozyten entspricht. Die zusätzlich eingefügte gestrichelte Linie in den Originalableitungen markiert 0 mV.

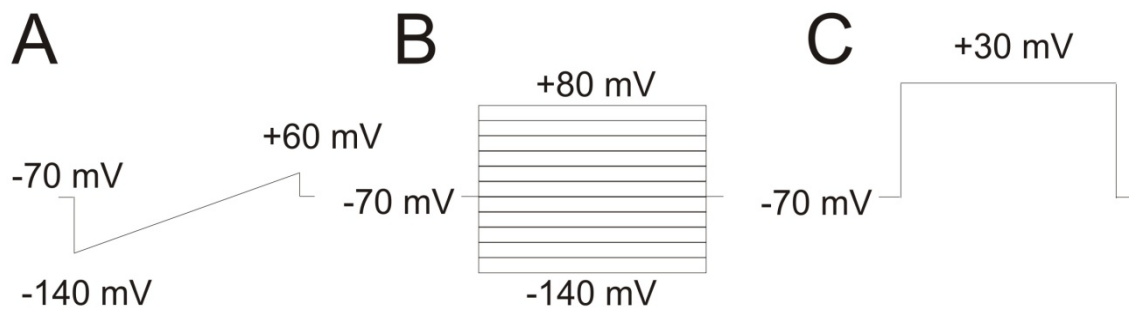


Abb. 8: Messprotokolle

(A) Positive Spannungsrampe von -140 mV bis +60 mV, 200 ms (B) Spannungssprünge (IV). Serie von Spannungssprüngen für 200 ms, ausgehend von einem Haltepotenzial von -70 mV, Testpulsbereich: -140 mV bis +80 mV, Inkrement: 20mV. (C) „Many Jump“ Messung. Ausgehend von einem Haltepotenzial von -70 mV erfolgen im Abstand von 3 s Stromsprünge auf ein Potenzial von +30 mV (Dauer: 200 ms). Die Aufzeichnung des gemessenen Stromes erfolgt in diesem Intervall

2.3 Auswertung der Daten und Statistik

Alle Daten wurden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) für n Experimente im Text angegeben. In Tabellen sowie in Diagrammen wurde die Standardabweichung (STABW) angegeben, wenn nicht anders bezeichnet. Alle im Text verwendeten Formulierungen wie „durchschnittlich“ oder „im Mittel“ beziehen sich auf den arithmetischen Mittelwert. Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit dem Microsoft-Office Programm Excel (Microsoft Corporation, Microsoft Office[®] 2004, Seattle, USA). Hiermit wurde auch die Prüfung auf Signifikanz vorgenommen, wozu der gepaarte t-Test nach Student verwendet wurde. Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit p für $p \leq 0,05$ angenommen. Das heißt, war $p \leq 0,05$ bedeutete dies, dass die getestete Hypothese mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit zutreffend war. Bei $p \leq 0,01$ waren die Ergebnisse hochsignifikant, da die Irrtumswahrscheinlichkeit bei nur 1 % lag. Die Prüfung der Werte auf ihre Normalverteilung wurde mittels des Kolmogorov- Smirnov- Tests im Programm SPSS (SPSS[®] Inc., Chicago, USA) überprüft. Um verzerrende Messergebnisse zu berücksichtigen, die aus

äußeren Einflussfaktoren wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Materialermüdung, Qualität der Oozyten oder technischen Fehler etc. herrührten, wurde in jedem Versuch für n eine Anzahl möglichst ≥ 10 Oozyten angestrebt.

Die aus den elektrophysiologischen Messungen gewonnen arithmetischen Mittelwerte $E_x = 100 \% - x (1,0 - x)$ wurden in Bezug zu dem jeweiligen Maximalwert $E_{\max} = 100 \% (1,0)$ gesetzt. Um Dosis-/Wirkungsbeziehungen zu ermitteln, wurden die Ergebnisse mithilfe der Hill- Funktion berechnet und ausgewertet.

$$y = E_{\min} + \frac{(E_{\max} - E_{\min})}{[1 + (\frac{EC_{50}}{c})^{n_H}]}$$

E_{\max}	Effekt bei maximaler Konzentration der Substanz
E_{\min}	Effekt bei minimaler Konzentration der Substanz
EC_{50}	Konzentration, bei der ein halb-maximaler Effekt eintritt
c	Konzentration der Substanz
n_H	Hill – Koeffizient

Die Auswertung, die Ermittlung des Halbmaximalen Effekts EC_{50} und die graphische Umsetzung in Dosis-/Wirkungs- Kurven erfolgte durch das Programm IGOR Pro[®] Version 5.0 (WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, OR, USA).

Die in der Arbeit dargestellten Originalableitungen wurden von der Messplatzsoftware Pulse & Pulse fit (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) in das Programm IGOR Pro (IgorPro 5.0[®], Wavemetrics, Portland, USA) importiert und anschließend bearbeitet. Die grafische Darstellung der gezeigten Balkendiagramme erfolgte mit dem Microsoft-Office Programm Excel (Microsoft Corporation, Microsoft Office[®] 2004, Seattle, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Koexpression der GPCRs 5-HT_{1A} und 5-HT₇

Basierend auf den Untersuchungen von Prof. Dr. Ponimaskin, der mithilfe eines Coimmunpräzitationsverfahrens zeigen konnte, dass *in vivo* eine Heterodimerisierung der G- Protein gekoppelten Rezeptoren 5-HT_{1A} und 5-HT₇ existiert (Kobe et al., 2008), ergibt sich für die vorliegende Arbeit die Kernfrage: Besitzt die Heterodimerisierung dieser beiden Rezeptoren eine funktionelle Relevanz und damit eine physiologische Bedeutung. Den Ausgangspunkt, um diese Frage experimentell zu überprüfen, bildet die Untersuchung des 5-HT_{1A} Rezeptors in homomerer Expression. Dieser Versuch stellt die Basis für den folgenden Vergleich dar mit der heteromeren Koexpression von 5-HT_{1A} und 5-HT₇.

Im Folgenden wird das Rezeptorheterodimer bestehend aus den Rezeptoren 5-HT_{1A} und 5-HT₇ nachfolgend als [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R bezeichnet. Der Signalkomplex aus 5-HT_{1A} und GIRK 1/2 wird als System [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK bezeichnet, der Signalkomplex 5-HT₇ und TASK-1 als [5-HT₇– TASK-1]-SK.

3.1.1 Effekte von Serotonin auf [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK

Die funktionelle Untersuchung des 5-HT_{1A} Rezeptors mithilfe des *Voltage Clamp* Verfahrens ist bereits in der Literatur beschrieben (Wischmeyer, 1997). Die Wiederholung dieses Experiments im Rahmen der vorliegenden Arbeit diente entsprechend dazu, eine Referenzgruppe zu generieren.

Bekanntermaßen ist der 5-HT_{1A} Rezeptor an ein hemmendes G_{i/o}- Protein gekoppelt. Als Effektorproteine wurden deshalb Kir3- Kanäle verwendet, G- Protein gekoppelte einwärtsgerichtete K⁺- Kanäle, genannt GIRK. Im vorliegenden Fall wurde das Heteromer GIRK 1/2 verwendet.

Für die Charakterisierung wurde eine heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten vorgenommen. Die Kanalfunktion wurde dabei in Abhängigkeit von der Zellmembranspannung und der extrazellulären K^+ -Konzentration überprüft. Die Kopplung der Kir3- Kanäle an das G- Protein bzw. den 5-HT_{1A} Rezeptor wurde schließlich durch eine Stimulation mit unterschiedlichen Serotoninkonzentrationen (5-HT) untersucht.

Es wurden die Basal- und die 5-HT- induzierten Ströme mittels ca. dreiminütiger Ableitungen gemessen, wobei die Oozyten konstant auf -70 mV geklemmt wurden. Dabei befanden sich die gemessenen Oozyten zunächst in einer Badlösung mit 2 mM K^+ . Die Amplitude der Kir3- Kanalströme änderte sich dann entsprechend der Veränderung der K^+ -Konzentration im Bad (Lösung mit 96 mM K^+), die 5-HT- induzierten Ströme entsprechend der Konzentration an Serotonin (Abb. 9). Als Konzentrationen wurden appliziert: 2 nM, 5 nM, 10 nM, 30 nM, 50 nM, 80 nM, 100 nM, 150 nM, 250 nM und 500 nM Serotonin (5-HT). Höhere Konzentrationen ergaben keinen gesteigerten Stromfluss.

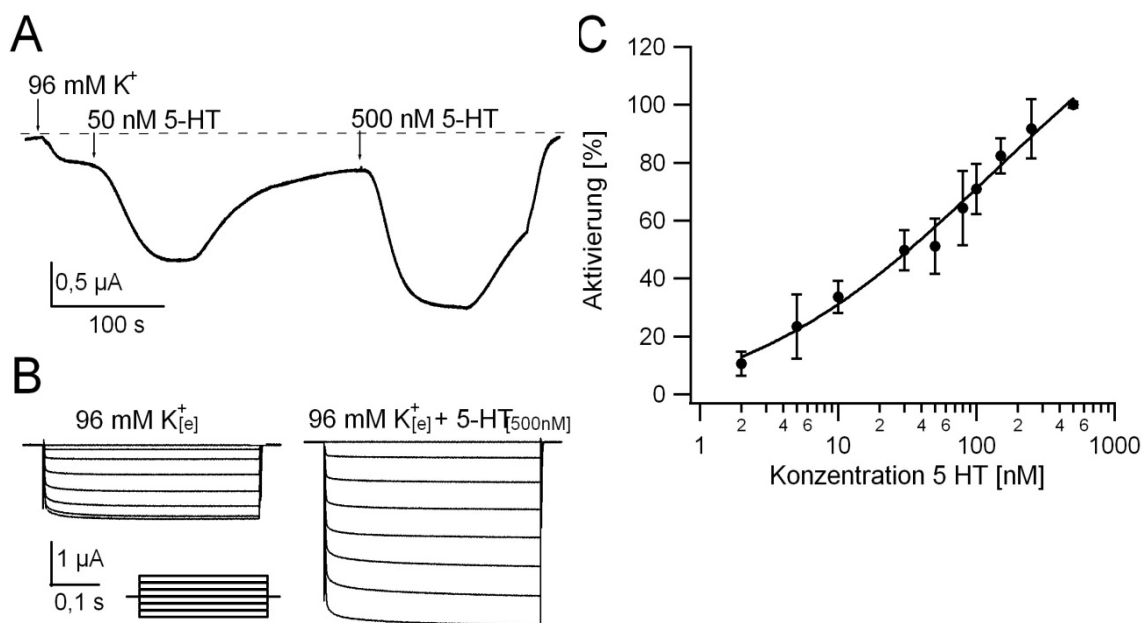


Abb. 9: Die aktivierende Wirkung von Serotonin (5 HT) auf die GIRK 1/2 Kanalaktivität.

GIRK- Kanal cRNA wurde zusammen mit 5-HT_{1A} cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten koexprimiert. (A) zeigt eine Originalableitung einer Langzeitmessung. Das Membranpotenzial ist bei -70 mV geklemmt in 2 mM K^+ - Lösung. Die Applikation ansteigender Serotoninkonzentrationen bewirkt eine Zunahme des rezeptorinduzierten Stroms. (B)

Spannungssprünge von +80 bis -140 mV induzieren einen langsam aktivierenden Basalstrom (96 mM K⁺) und einen agonisteninduzierten Strom (96 mM K⁺ + 5-HT) mit gleichen kinetischen Eigenschaften. Die Stromamplitude ist deutlich größer. (C) Dosis-/Wirkungskurve für unterschiedliche Serotoninkonzentrationen. Die Messpunkte wurden durch eine Hill- Gleichung der Form $I/I_{max} = 1/1 + (EC_{50}/[A])^n$ mit $[EC_{50}] = 57,64 \mu\text{M}$ und dem Hill- Koeffizienten n angepasst. Dargestellt sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Messungen.

Die Dosis-/Wirkungskurve (Abb. 9) ergab eine halbmaximale Aktivierung bei einer Konzentration des Agonisten von $57,64 \pm 16,6 \text{ nM}$. Die Betrachtung der Messergebnisse zeigt, dass im Mittel ein maximaler Strom von $4,08 \pm 0,25 \mu\text{A}$ erreicht wurde ($n = 24$). Der Vergleich der Basalströme mit den 5-HT-induzierten Strömen ergab, dass der maximal induzierte Strom im Mittel $1,44 \pm 0,09 \mu\text{A}$ (SEM) betrug, entsprechend 35,4 % des Gesamtstroms, wobei der agonisteninduzierte Strom durch Auswaschen wieder auf das Niveau des Basalstroms gebracht werden konnte.

Neben dieser Messtechnik wurde ein Spannungssprungprotokoll verwendet, mit einer Serie von Membranspannungssprüngen mit einer Dauer von 500 ms (Abb. 9). Dies ermöglichte einerseits die erneute Darstellung des Kir3- Stroms mit den Komponenten Basal- und rezeptorinduziertem Strom, andererseits konnte hiermit die Aktivierungskinetik des Kanals genauer betrachtet werden. Diese Messungen zeigten, dass sowohl der Basal- als auch der agonisteninduzierte Strom mit zunehmender Hyperpolarisierung der Oozytenmembran zunahm. Die größten Amplituden konnten jeweils bei den agonistenabhängigen Strömen gemessen werden. Auffällig war zudem, dass die Kinetik beider Ströme gleich war: Das heißt, es konnte eine verzögerungslose Aktivierung sowie ein über den Zeitraum des Spannungssprungs hinweg konstanter Strom beobachtet werden. Diese übereinstimmenden Eigenschaften der Basal- und Agonistenströme zeigen, dass beide Stromkomponenten GIRK 1/2 vermittelt sind.

3.1.2 Untersuchung des Einflusses der Koexpression von 5-HT₇ auf [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK

Um den Einfluss der Koexpression 5-HT₇ auf [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK zu untersuchen, wurde der gleiche Versuchsaufbau gewählt wie bei der vorausgegangenen Untersuchung von [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK.

Entsprechend wurde in *Xenopus laevis* Oozyten die cRNA des GIRK 1/2 Kanals und des 5-HT_{1A}- Rezeptors zusammen mit der cRNA des 5-HT₇- Rezeptors in äquivalenten Mengen heterolog exprimiert. Dabei stellte [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK das Basissystem dar, der 5-HT₇ Rezeptor wurde koexprimiert: Das heißt, die Stimulation des G_{i/o}- Protein durch den 5-HT_{1A} Rezeptor wurde als Signalweg genutzt, wohingegen der 5-HT₇ Rezeptor keine direkte bekannte Wirkung auf den GIRK 1/2 Kanal hat.

Die Kanal- und Rezeptorfunktion wurde wiederum mittels unterschiedlicher Kalium bzw. Serotoninkonzentrationen untersucht. Zur Kontrolle wurden Zellen mit GIRK 1/2 und dem 5-HT_{1A} Rezeptor herangezogen. Um auch hier äquivalente Mengen an GIRK 1/2- und 5-HT_{1A}- cRNA in den Oozyten zu exprimieren, wurde die dritte Komponente, der 5-HT₇ Rezeptor, durch Wasser (H₂O) ersetzt.

Bei den Messungen lag der Fokus auf der Untersuchung der Amplitude der Basal- und rezeptorinduzierten Ströme sowie auf der Kanalkinetik.

Die Ströme wurden mittels ca. dreiminütiger Ableitungen untersucht, wobei die Oozyten konstant auf -70 mV geklemmt wurden. Das Protokoll entsprach demnach den Messungen zur Ermittlung der Dosis-/Wirkungskurve von GIRK 1/2 mit dem 5-HT_{1A} Rezeptor: die Oozyten befanden sich zunächst in einer Badlösung mit 2 mM K⁺; die Amplitude der Kir3- Kanalströme änderte sich dann entsprechend der Konzentration des K⁺ im Bad (Lösung mit 96 mM K⁺), die 5-HT- induzierten Ströme entsprechend der Konzentration an Serotonin. Dabei wurden jedoch nur zwei Konzentrationen von 5-HT gewählt: 100 nM und 500 nM; letztere, um die optimale Aktivierungsrate der Kir3- Proteine über den 5-HT_{1A} Rezeptor sicherzustellen.

Allein durch die Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration von 2 mM auf 96 mM konnte ein einwärtsgerichteter Strom induziert werden. Dieser war bei der Koexpression von [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R signifikant geringer ($p < 0,0001$), entsprechend einem Wert von $0,53 \pm 0,08 \mu A$ ($n = 29$) im Vergleich zur Kontrollgruppe, wo [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK ohne den 5-HT₇ Rezeptor exprimiert wurde: $1,45 \pm 0,14 \mu A$ ($n = 23$). Die Differenz der Mittelwerte beträgt demnach $0,92 \mu A$.

Bei Applikation des Rezeptoragonisten Serotonin in der Konzentration 100 nM konnte gezeigt werden, dass auch hier die Stromamplitude des rezeptorinduzierten Stromes bei Koexpression von 5-HT₇ zu [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK signifikant kleiner ist ($p < 0,0001$). Es ergab sich ein Wert von $0,31 \pm 0,04 \mu A$, entsprechend einem Mittelwert des Gesamtstroms von $0,84 \pm 0,11 \mu A$, in der Kontrollgruppe ohne 5-HT₇ ergab sich als Wert des Gesamtstroms $2,61 \pm 0,2 \mu A$. Bei Applikation von 500 nM ergab sich ebenfalls eine signifikante Reduktion der Stromamplitude des rezeptorinduzierten Stromes ($p < 0,0001$): Bei der Koexpression von 5-HT₇ zu [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK betrug der Mittelwert des Gesamtstromes $0,81 \pm 0,11 \mu A$, bei der Kontrollgruppe ohne 5-HT₇ ergab sich $2,81 \pm 0,21 \mu A$. Diese Werte sind in Abbildung 10 dargestellt. Somit konnte gezeigt werden, dass die Stromamplitude des rezeptorinduzierten Stromes signifikant kleiner ist ($p < 0,0001$).

Der verstärkte Strom konnte durch Entfernen des Agonisten auf das Niveau des Basalstroms zurückgeführt werden. Der Basalstrom wurde durch die Einstellung des Badmediums auf die ursprüngliche K^+ -Konzentration (2 mM) inaktiviert.

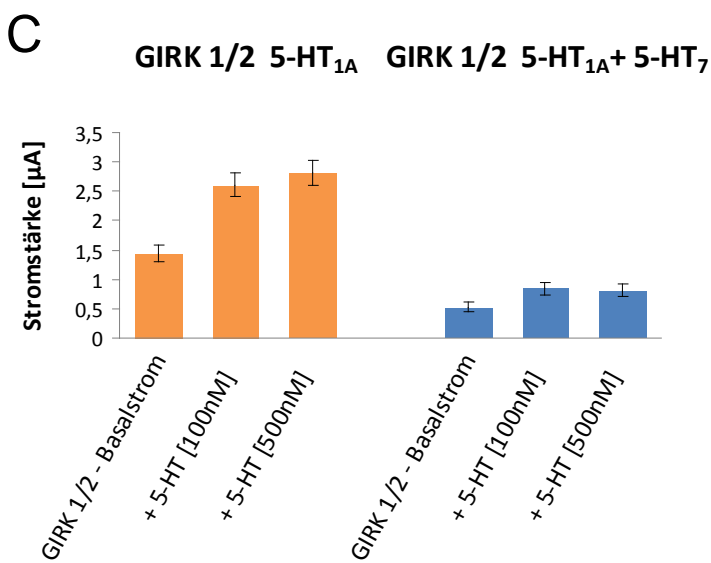
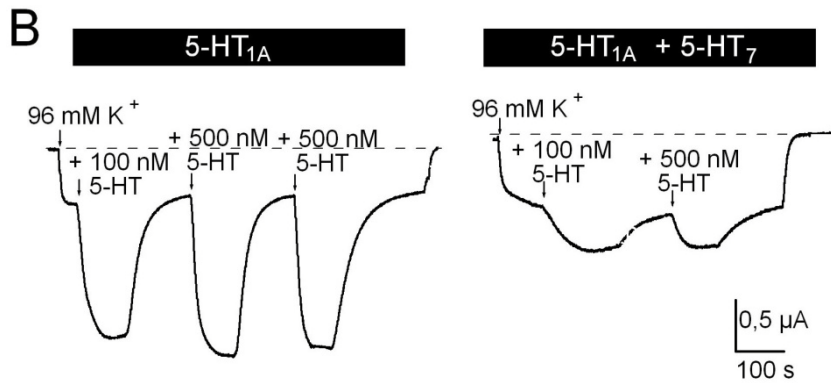
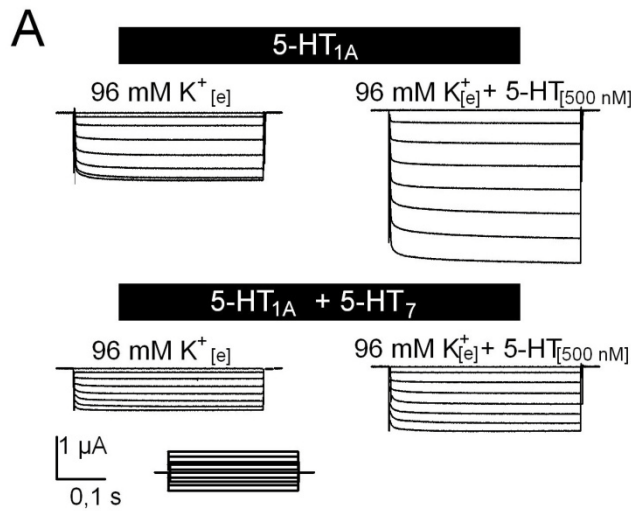


Abb. 10: Basal- und rezeptorinduzierter Strom bei der Expression von [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R

Vergleich von [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R mit der homomeren Expression von 5-HT_{1A} als Kontrolle. Als K⁺-Kanal wurde in beiden Fällen GIRK 1/2 verwendet. (A) Gegenüberstellung einer Spannungssprung-messung der heterodimerisierten Expression [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R (unten) und der homomeren Kontrolle ohne

Koexpression von 5-HT₇ (oben). Spannungssprünge von +80 mV bis -140 mV für eine Dauer von 500 ms, bei einem Haltepotenzial von -70 mV. Jeweils links im Bild sind Ableitungen bei 96 mM K⁺ Badlösung zu sehen, rechts sind Kurven bei Aktivierung durch 5-HT in der Konzentration 500 nM dargestellt, wobei eine deutliche Reduktion des Stroms bei der Expression des Heterodimers (unten) im Vergleich zur Kontrolle (oben) zu beobachten ist. (B) Darstellung einer originalen Langzeitableitung der heterodimeren Koexpression (rechts) und der homomeren Kontrolle (links). Das Haltepotenzial betrug -70 mV bei 2 mM K⁺ Badlösung. Die Applikation von 5-HT in den Konzentrationen 100 nM und 500 nM bewirkte eine Kanalaktivierung, die bei [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R signifikant geringer ausfiel als bei der Kontrolle. (C) Quantifizierung des GIRK-Basalstroms sowie des rezeptorinduzierten Stroms bei der heterodimeren Koexpression (rechts) und der Kontrolle (links). Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung der normalisierten Daten an.

Um die Kanalkinetik zwischen [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK einerseits und diesem Signalkomplex mit der zusätzlichen Expression des 5-HT₇ Rezeptor andererseits darzustellen, wurde wiederum auf das Spannungssprungprotokoll zurückgegriffen. Diese Messungen zeigten, dass sich durch die Heterodimerisierung der beiden Serotoninrezeptoren keine evidenten Änderungen in der Kinetik ergeben: Die Aktivierungskinetik stimmte überein, zudem konnte man eine verzögerungslose Aktivierung sowie einen über den Zeitraum des Spannungssprungs hinweg konstanten Strom beobachten. Den einzigen sichtbaren Unterschied stellte erwartungsgemäß die Stromamplitude dar: Zwar war auch bei den GIRK 1/2 injizierten Oozyten, welche die heterodimerisierten Rezeptoren exprimiert hatten, der agonisteninduzierte Strom größer als der Basalstrom, die absolute Stromamplitude war jedoch deutlich kleiner als in den Kontrolloozyten ohne 5-HT₇ (Abb. 10).

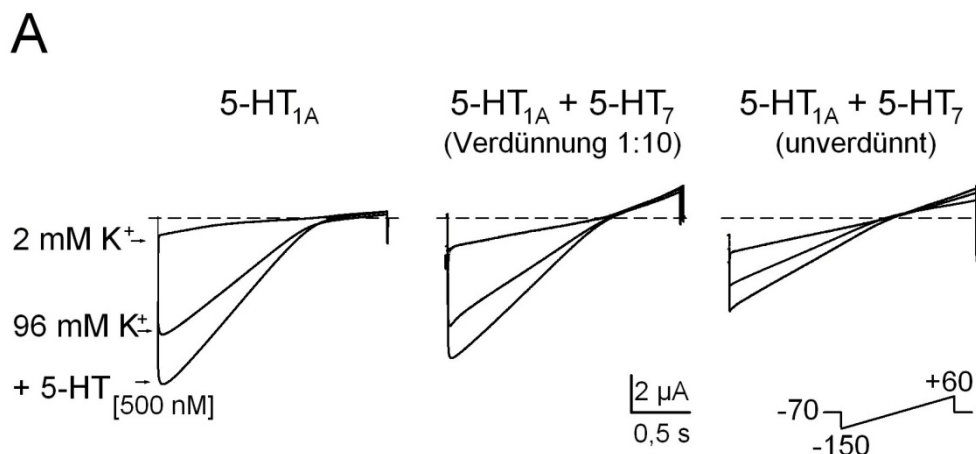
Mithilfe dieses Experiments konnte der Beweis erbracht werden, dass die Rezeptorheterodimerisierung [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R einen signifikanten Einfluss auf die an GIRK 1/2 gemessene Stromamplitude besitzt, wobei diese Unterschiede sowohl bei der Amplitude des Basal- als auch des agonisteninduzierten Stroms zu messen sind. In einem nächsten Schritt der funktionellen Charakterisierung dieses Heterodimers sollten physiologische Eigenschaften systematisch überprüft werden.

3.2 Charakterisierung der physiologischen Eigenschaften der Heterodimerisierung [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R

Um verschiedene physiologische Eigenschaften bzw. Parameter dieses Rezeptorheterodimers zu überprüfen, wurde am Aufbau des Versuchssystems primär nichts verändert. Das heißt, es wurde wiederum [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK mit 5-HT₇ als koexprimiertem Rezeptor verwendet.

3.2.1 Überprüfung der Dosisabhängigkeit der inhibitorischen Wirkung von 5-HT₇ durch den Vergleich unterschiedlicher cRNA Konzentrationen

Zunächst sollte geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der exprimierten Menge an 5-HT₇ und dem messbaren Kir- Kanalstrom besteht. Hierzu wurde der Versuchsaufbau, wie oben beschrieben, belassen. Von der 5-HT₇ Rezeptor cRNA wurden Verdünnungen im Verhältnis Wasser zu cRNA = 5:1 und 10:1 angelegt und zusammen mit [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK injiziert und heterolog exprimiert.



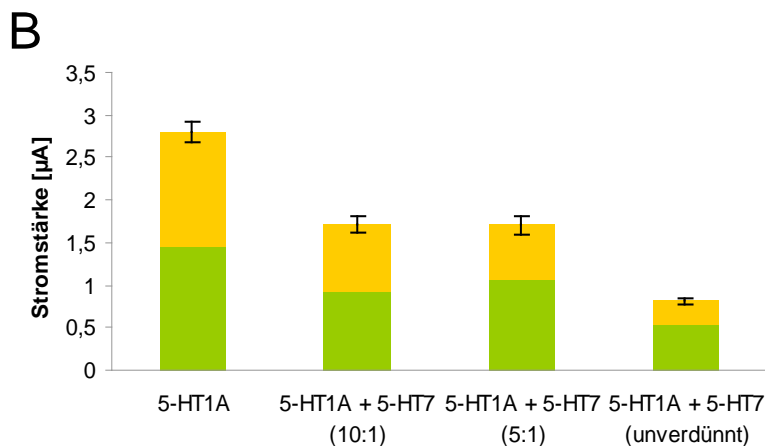


Abb. 11: Konzentrationsabhängigkeit der GIRK- Stromstärke des Rezeptorheterodimers von der Konzentration des 5-HT₇ Rezeptors

Ganzzelleableitungen von *Xenopus laevis* Oozyten. (A) Strom-aufzeichnung mittels Spannungsrampen bei einer kontinuierlichen Variation des Stroms von -150 mV

bis +60 mV, bei einem Haltepotenzial von -70 mV. Dargestellt ist der GIRK- Strom beim Heterodimer [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R, wobei 5-HT₇ in der unverdünnten Form vorliegt (rechts), im Vergleich zur heterodimeren Expression mit einer 10:1 verdünnten Form des 5-HT₇ Rezeptors (Mitte). Links ist als Kontrolle [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK ohne Koexpression von 5-HT₇ dargestellt. Das Spannungsrampenprotokoll zeigt eine signifikante Reduktion sowohl des Basal- als auch des rezeptorinduzierten Stroms bei der heterodimerisierten Koexpression, die bei der verdünnten Form (10:1) deutlich geringer ausfällt. (B) Quantifizierung der Stärke des GIRK-Stroms bei den unterschiedlichen Koexpressionen, zusätzlich 5:1 Verdünnung (grün: Kir-Basalstrom, gelb: rezeptorinduzierter Strom 5-HT, 500 nM).

Die Messungen an diesen Oozyten konnten eine Dosisabhängigkeit zeigen, so dass entsprechend die Reduzierung des Kir- Stroms bei den Oozyten, in denen ein cRNA Injektionsverhältnis von 5:1 bzw. 10:1 vorlag, geringer ausfiel als bei den Messungen der unverdünnten 5-HT₇ cRNA. Für den 5:1 verdünnten Ansatz der 5-HT₇ cRNA konnte eine mittlere maximale Aktivierung des rezeptorinduzierten Stroms (5-HT, 500 nM) von $1,71 \pm 0,11 \mu\text{A}$ ($n = 15$) (Kir-Basalstrom: $1,06 \pm 0,23 \mu\text{A}$) gemessen werden, bei der 10:1 verdünnten Form ein Mittelwert von $1,71 \pm 0,16 \mu\text{A}$ ($n = 15$) (Kir- Basalstrom: $0,91 \pm 0,09 \mu\text{A}$). Die Kontrolle ohne 5-HT₇ erbrachte einen Wert von $2,80 \pm 0,11 \mu\text{A}$ ($n = 23$) (Kir-Basalstrom: $1,45 \pm 0,14 \mu\text{A}$), die unverdünnte Form des 5-HT₇ Rezeptors einen Gesamtstrom von $0,81 \pm 0,11 \mu\text{A}$ ($n = 29$) (Kir- Basalstrom $0,53 \pm 0,08 \mu\text{A}$).

Im Bezug auf die Messergebnisse der Koexpression von GIRK 1/2 5-HT_{1A} – 5-HT₇ (5:1) mit der unverdünnten Form des 5-HT₇ Rezeptors konnte damit sowohl für den basalen GIRK- Strom als auch für den rezeptorinduzierten Strom ein

signifikanter (Basalstrom: $p = 0,01$) bzw. hoch signifikanter (rezeptorinduzierter Strom $p = 0,001$) Unterschied gezeigt werden.

Für die Messungen mit der 10:1 verdünnten Form konnte diese Signifikanz ebenfalls bestätigt werden. Hier ergaben sich folgende p -Werte: Basalstrom $p < 0,001$ und rezeptorinduzierter Strom $p < 0,001$.

Diese Ergebnisse lassen somit den Schluss zu, dass die Reduktion der GIRK 1/2 Kanalaktivität signifikant von der Konzentration der RNA des 5-HT₇ Rezeptors abhängig ist. Das heißt, je größer die Konzentration der 5-HT₇ Rezeptor- cRNA ist, umso größer ist die Reduktion der Kanalaktivität von GIRK (siehe Abb. 11).

Mit den bisherigen Versuchen konnte somit zum einen dargestellt werden, dass die Heterodimerisierung der Serotoninrezeptoren [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R in Verbindung mit den Effektorproteinen in Form von GIRK 1/2- Kanälen eine Verringerung der Stromamplitude, gemessen als GIRK- Strom, zur Folge hat. Dies gilt sowohl für den Basalstrom der Kir- Untereinheiten als auch für den rezeptorinduzierten Strom. Dabei waren beide Effekte auswaschbar und damit reversibel.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Dosis der exprimierten Menge an 5-HT₇ Protein einen Einfluss auf die Stromamplitude hat, nicht aber auf kinetische Parameter der Stromaktivierung.

Hieraus ergibt sich die Frage, ob die gemachten Beobachtungen spezifisch sind für [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R oder ob auch andere GPCR in der Lage sind, in Verbindung mit dem 5-HT_{1A} Rezeptor derartige Veränderungen in der Stromamplitude hervorzurufen.

3.2.2 Heterologe Expression der Rezeptoren 5-HT₇, 5-HT_{2C}, H1 und B1

Um die Spezifität der 5-HT₇ Wirkung im Sinne der Heterodimerisierung mit dem 5-HT_{1A} Rezeptor zu charakterisieren, wurde die Versuchsanordnung

folgendermaßen verändert. Neben Oozyten, denen die cRNA von [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK sowie H₂O als Kontrolle injiziert wurde, sowie solchen, in denen die cRNA von [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK und dem 5-HT₇ Rezeptor exprimiert wurde, wurden nun verschiedene weitere Rezeptoren koexprimiert.

Die Auswahl dieser Rezeptoren wurde unter verschiedenen Gesichtspunkten getroffen. Einmal sollte getestet werden, ob die Unterschiede, die bei der Amplitude des Kanalstroms gemessen werden konnten, dadurch zu begründen sind, dass bei den Kontrolloozyten neben der Kir- und der 5-HT_{1A}- cRNA als dritte Komponente lediglich H₂O injiziert wurde. Der Proteinbiosyntheseapparat der Zelle musste bei den Kontrolloozyten demnach nur zwei cRNA-Komponenten translatieren, während bei den Oozyten, in die Kir-, 5-HT_{1A}- und 5-HT₇- cRNA eingebracht wurde, 33,3 % mehr RNA zu prozessieren war. Das heißt rein quantitativ musste bei diesen mehr RNA in Genprodukte, sprich Proteine, umgesetzt werden, was letztlich den geringeren Strom erklären könnte. Hierzu wurden ein Histamin (H1)- und ein Bradykinin (B1)- Rezeptor verwendet.

Ein zweiter Gesichtspunkt, um die Spezifität der Heterodimerisierung von 5-HT_{1A} und 5-HT₇ näher zu charakterisieren, war die Frage, ob auch andere Rezeptoren als der 5-HT₇ Rezeptor bzw. andere Signaltransduktionswege als der über ein G_s- Protein mit [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK interagieren bzw. einen messbaren Effekt darauf ausüben. Dies konnte ebenfalls mittels des H1- und des B1- Rezeptors untersucht werden. Denn diese koppeln an ein G_q- Protein – sie nutzen also einen intrazellulären Signalweg, der in den bisherigen Experimenten nicht eingebunden war.

Eine dritte Fragestellung war schließlich, ob die nachgewiesenen Effekte unter Umständen rezeptorfamilien-spezifisch sind. Um dies zu überprüfen, wurde ein weiterer Vertreter der humanen 5-HT- Rezeptoren heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten koexprimiert: Der 5-HT_{2C} Rezeptor. Anders als der 5-HT_{1A} Rezeptor koppelt dieser an ein G_q- Protein. Dabei findet keine direkte Interaktion zwischen diesem und den Kir3- Kanälen statt, die bekanntlich an ein G_{i/o}- Protein koppeln.

Das Schema der Messungen wurde im Vergleich zu den vorangegangenen Experimenten nicht verändert. Um auszuschließen, dass eventuelle Konzentrationsschwankungen der injizierten cRNA falsche Messergebnisse verursachten, wurden alle verwendeten cRNA- Ansätze auf eine einheitliche Konzentration von 30 ng/ μl eingestellt.

Es wurden dementsprechend fünf verschiedene Rezeptorkombinationen bzw. Konzentrationen heterolog exprimiert und gemessen: Neben der Kontrolle ([5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK und H₂O) das System [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK mit den Koexpressionen: 5-HT₇, 5-HT_{2C}, H1 und B1.

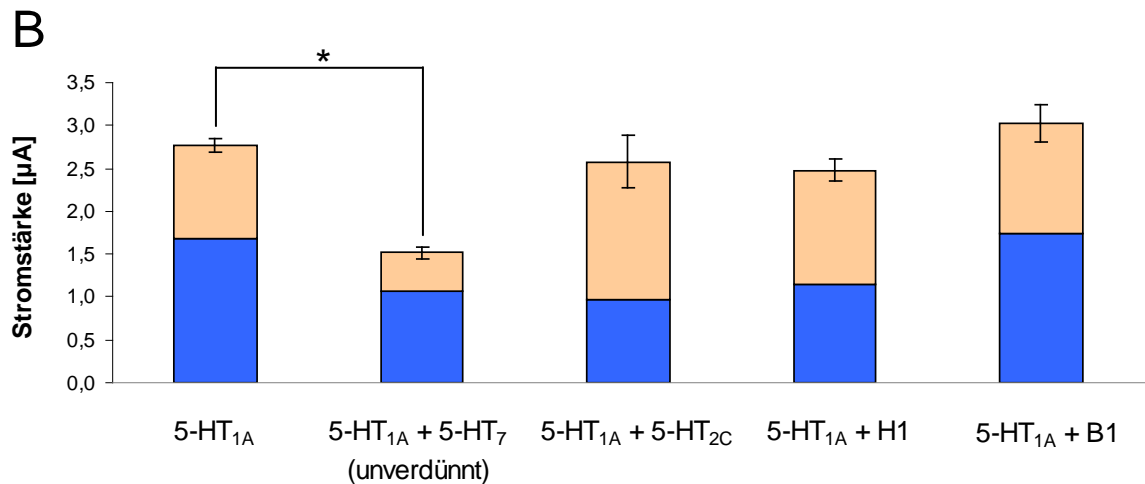
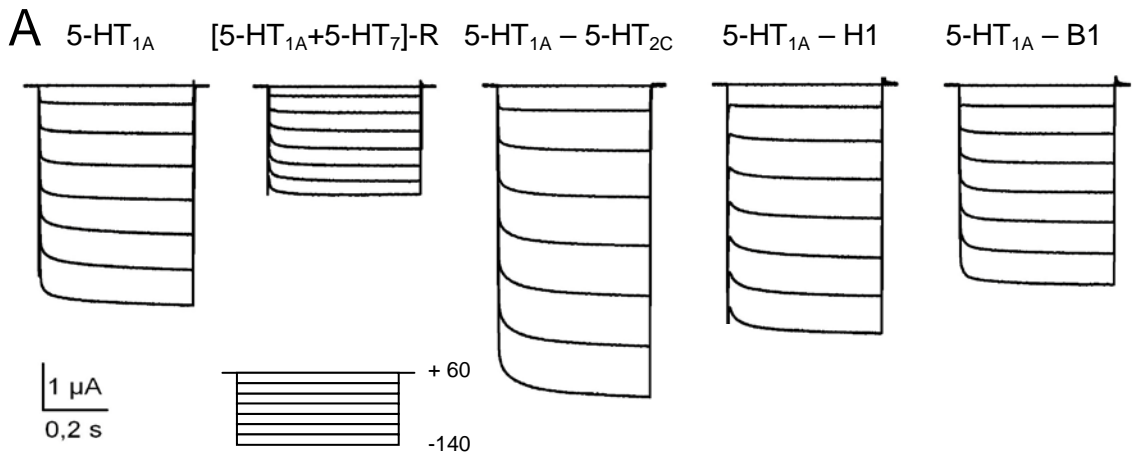


Abb. 12: Vergleich der Koexpressionen verschiedener GPCRs zu [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK

(A) Zeigt Originalableitungen des Spannungssprungprotokolls (+80 bis -140 mV bei -70 mV Haltepotenzial) verschiedener Rezeptorkoexpressionen zu [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK bei Applikation von 5-HT in der Konzentration 500 nM. Die Ableitungen zeigen den signifikanten Unterschied des rezeptorinduzierten GIRK- Stroms bei der Koexpression von 5-HT₇ im Vergleich zu den anderen koexprimierten GPCRs bzw. zur Kontrolle [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK + H₂O. (B) Quantifizierung des Verhaltens der Basal- bzw. rezeptorinduzierten- Zellströme im Vergleich. Dargestellt sind im Säulendiagramm die jeweiligen Mittelwerte der gemessenen Basalströme sowie die rezeptorinduzierten Ströme bei Applikation von 5-HT in den Konzentrationen 100 nM und 500 nM. Die Säulen zeigen absolute Mittelwerte (blau: Kir-Basalstrom, rosa: rezeptorinduzierter Strom 5-HT, 500 nM).

Die Auswertung der Messungen bestätigte die signifikante Reduktion des Kir-Basalstroms sowie des rezeptorinduzierten Stroms der heteromeren Expression von 5-HT₇ zu [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK im Vergleich zur Kontrollgruppe [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK, die bereits in den vorangegangenen Experimenten nachgewiesen wurde. Der Mittelwert der maximalen Gesamtaktivierung (Basalstrom plus rezeptorinduzierter Strom) betrug bei [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R $1,71 \pm 0,11 \mu\text{A}$ ($n = 15$). Signifikanzniveau im Bezug auf [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R wurde ebenfalls erreicht bei der rezeptorvermittelten Maximalaktivierung aller vergleichend getesteten GPCR: 5-HT_{2C}, H1 und B1. Bei 5-HT_{2C} ergab sich als Wert $2,58 \pm 0,13 \mu\text{A}$ ($n = 5$), bei der Koexpression von H1: $2,48 \pm 0,31 \mu\text{A}$ ($n = 4$) und bei B1: $3,02 \pm 0,22 \mu\text{A}$ ($n = 7$).

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der verschiedenen Rezeptorkopplungen konnte mehrere Dinge zeigen: Zum einen konnte belegt werden, dass der Unterschied in der Stromamplitude bei der Heterodimerisierung [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R zusammen mit dem GIRK 1/2 Kanal im Vergleich zur Kontrolle nicht auf die unterschiedlicher Menge an injizierter cRNA zurückzuführen ist, denn auch bei den Oozyten, in denen H1, B1 und 5-HT_{2C} koexprimiert wurde, konnte deutlich mehr Stromfluss nachgewiesen werden als in der Vergleichsprobe mit der Koexpression von 5-HT₇. Dies war sowohl beim Basal- als auch beim rezeptorinduzierten Strom nachzuvollziehen. Darüber hinaus wurde bei der Kopplung mit dem 5-HT_{2C} Rezeptor eine Stromamplitude gemessen, die in einigen Fällen sogar größer war als bei der Kontrolle.

Zum andern konnte gezeigt werden, dass die Heterodimerisierung insofern spezifisch ist, dass die Messungen keine Ergebnisse lieferten, die einen Hinweis darauf geben, dass es zwischen den unterschiedlichen heterologen Rezeptorkoexpressionen zu Interaktionen kommt, die ähnliche Effekte bewirken wie bei der Expression von [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R. Das heißt die gemessenen Ergebnisse sprechen dafür, dass es keine Interaktion zwischen dem 5-HT_{1A} Rezeptor und dem H1-, B1 oder 5-HT_{2C}- Rezeptor in Form einer Heterodimerisierung gibt. Aus den elektrophysiologischen Daten ist vielmehr zu schließen, dass die koexprimierten Rezeptoren parallel zu [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK in den *Xenopus laevis* Oozyten existieren und dessen Funktionalität oder auch dessen Kinetik nicht beeinflussen, so dass der Schluss zu ziehen ist, dass die vorliegenden Effekte einer Stromreduktion bei der Koexpression von 5-HT₇ spezifisch für diese Heterodimerisierung sind.

Um Aussagen über die Kinetik der einzelnen Expressionssysteme machen zu können, wurde erneut das Spannungssprungprotokoll verwendet (Abb. 12). Als Ergebnis dieser Messungen konnte beobachtet werden, dass sowohl der Basal- als auch der agonisteninduzierte Strom mit zunehmender Hyperpolarisierung der Oozytenmembran zunahm. Die größten Amplituden konnten jeweils bei den agonistenabhängigen Strömen gemessen werden. Auffällig war zudem, dass die Kinetik beider Ströme gleich war. Dies bedeutet, dass davon auszugehen ist, dass der Strom bei allen untersuchten Rezeptorkombinationen durch die Kir3- Kanäle floss. Dies zeigt wiederum, dass die Funktionalität und die Kinetik von [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK nicht beeinflusst wurden.

Mittels dieses Versuchs konnte dargestellt werden, dass die Reduktion der Stromamplitude sowohl des Basal- als auch des rezeptorinduzierten Stroms auf die Koexpression des 5-HT₇ Rezeptors zurückzuführen ist.

Das heißt, die beobachteten Effekte können auf die Heterodimerisierung der beiden GPCRs [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R zurückgeführt werden und sind somit spezifisch.

Hieraus ergeben sich neue Fragestellungen nach den zugrunde liegenden Ursachen, wobei mehrere Faktoren in Betracht gezogen wurden. Die folgenden Versuche dienen zum einen zur Überprüfung, wie sich die GIRK- Ströme des

Rezeptorheteromere nach Applikation eines Rezeptorantagonisten verhalten (Kap 3.2.3.1). Zum anderen sollte überprüft werden, ob bei mehrfacher Applikation des Rezeptoragonisten Serotonin ein Desensibilisierungseffekt zu beobachten ist (Kap 3.2.3.2).

3.2.3 Untersuchung des Einflusses der funktionellen Inhibierung des 5-HT₇ Rezeptors auf die GIRK 1/2 Aktivität

3.2.3.1 Untersuchung des Dimers durch den reversen Rezeptorinhibitor Clozapin

Ob die Effekte, welche durch die Heterodimerisierung vermittelt wurden, reversibler Art sind und sich möglicherweise auf Ebene einer direkten Interaktion zwischen den beiden Rezeptoren 5-HT_{1A} und 5-HT₇ abspielen, sollte in einem weiterführenden Versuchsansatz geklärt werden.

Dies sollte überprüft werden, indem die *Xenopus laevis* Oozyten, in welche 5-HT_{1A} und 5-HT₇ koinjiziert wurde, vor der Messung in eine Badlösung mit einem Rezeptorinhibitor inkubiert wurden. Geprüft werden sollte dabei, ob die Inhibition des 5-HT₇ Rezeptors den beschriebenen Effekt einer Reduktion der Stromamplitude aufhebt.

Als Inhibitor wurde Clozapin verwendet, wobei diese Substanz keinen selektiven Inhibitor des 5-HT₇ Rezeptors darstellt; ein 5-HT₇ selektiver Inhibitor ist derzeit nicht bekannt.

Der Versuchsaufbau wurde entsprechend den vorangegangenen Experimenten gewählt. Für den Versuch wurden drei Oozytengruppen präpariert, zwei Gruppen mit [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R zusammen mit GIRK 1/2, die dritte mit [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK als Kontrolle. Die Messungen wurden in Form von Langzeitableitungen vorgenommen, außerdem kam das Spannungssprungprotokoll zum Einsatz. Direkt vor der Messung wurde eine Gruppe der Oozyten des [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R jeweils für 5 Minuten in 1 µM Clozapinlösung inkubiert, die Messung selbst erfolgte in 2 mM K⁺- Badlösung,

wobei die Oozyten konstant auf -70 mV geklemmt wurden. Die Amplitude der GIRK 1/2- Kanalströme änderte sich entsprechend der Veränderung der K⁺-Konzentration im Bad (Lösung mit 96 mM K⁺), die 5-HT- induzierten Ströme entsprechend der Konzentration an Serotonin (Vgl. Abb. 9). Als Konzentrationen wurden 100 nM und 500 nM Serotonin (5-HT) appliziert (Abb. 13).

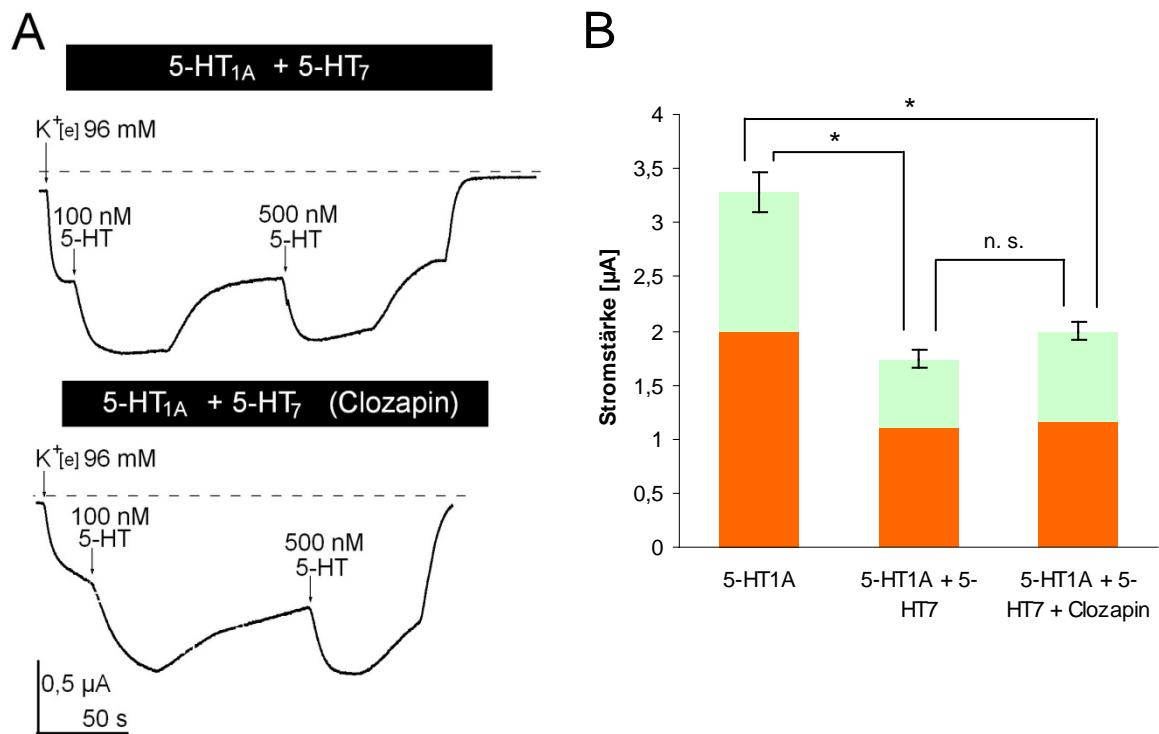


Abb. 13: Untersuchung des Einflusses von Clozapin

(A) zeigt die Gegenüberstellung originaler Langzeitableitung der heterodimeren Koexpression von 5-HT_{1A} und 5-HT₇, wobei die untere Ableitung die Messung nach Inkubation der Oozyte in 1 μM Clozapinlösung für 5 min zeigt. Das Haltepotenzial betrug -70 mV bei 2 mM K⁺ Badlösung. Die Applikation von 5-HT in den Konzentrationen 100 nM und 500 nM bewirkte eine Kanalaktivierung, die sowohl bei der in Clozapin inkubierten Oozyte wie auch der Kontrolle gleichermaßen zu beobachten war. (B) Statistische Auswertung des Versuchs, wobei zum Vergleich auch die Gruppe von Oozyten angegeben ist, die als Kontrolle keinen 5-HT₇ Rezeptor exprimiert hatten. Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung der normalisierten Daten an (rot: Kir-Basalstrom, grün: rezeptorinduzierter Strom 5-HT, 500 nM).

Der Vergleich der Mittelwerte der Stromamplituden zwischen den Oozyten des [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R, die vor der Messung in Clozapin inkubiert waren und denen,

die als Kontrolle nicht inkubiert wurden, erbrachte folgende Ergebnisse: Bei der Aktivierung mittels 100 nM 5-HT wurden bei den in Clozapin inkubierten Oozyten im Mittel $2,02 \pm 0,10 \mu\text{A}$ ($n = 12$) gemessen, bei der Kontrollgruppe $1,77 \pm 0,05 \mu\text{A}$ ($n = 20$).

Bei der Aktivierung mittels 500 nM 5-HT ergab sich im Mittel $2,00 \pm 0,09 \mu\text{A}$ (Clozapin inkubierte Oozyten; $n = 12$), bei den entsprechenden Kontrollen des [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R ohne Clozapin Inkubation $1,74 \pm 0,08 \mu\text{A}$ ($n = 13$). Zum direkten Vergleich wurde zudem nochmals [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK ohne 5-HT₇ überprüft, hier ergab sich ein Mittelwert der maximalen Aktivierung von $3,28 \pm 0,18 \mu\text{A}$ ($n = 9$).

Bei der GIRK 1/2- Strom Aktivierung mittels 96 mM K⁺ konnte nur ein marginaler Unterschied ($1,16 \pm 0,13 \mu\text{A}$ (Clozapin inkubierte Gruppe) zu $1,11 \pm 0,09 \mu\text{A}$ (Kontrolle) ermittelt werden. Diese Werte sind in Abbildung 13 dargestellt.

Diese Ergebnisse belegen, dass Clozapin nicht zur Aufhebung der Effekte der Heterodimerisierung von [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R führt, es wurde kein signifikanter Unterschied zu den Clozapin inkubierten Oozyten beobachtet. Das bedeutet, sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Versuchsgruppe der in Clozapin inkubierten Oozyten konnten Unterschiede in der Stromamplitude auf die Applikation des Agonisten festgestellt werden. Der Effekt des 5-HT₇ Rezeptors ist somit nicht auswaschbar.

3.2.3.2 **Untersuchung der Desensibilisierung des GIRK Stroms**

Im Rahmen dieses Experiments wurde zudem eine weitere Eigenschaft der als Heterodimer exprimierten Rezeptoren überprüft. Mittels der mehrmaligen Einwaschung gleicher Agonistenkonzentrationen sollte getestet werden, ob im Vergleich zu den Oozyten, in denen ausschließlich [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK exprimiert wurde, eine Desensibilisierung in Form eines Abfalls der Stromamplitude nachzuweisen ist. Dies zu überprüfen hatte den Zweck, weil in Hirnschnittpräparaten eine Desensibilisierung der 5-HT- Antwort gemessen

wurde, das molekulare Korrelat aber bisher nicht identifiziert ist (Okuhara and Beck, 1994).

Dies wurde an 12 Oozyten ($n = 12$) mit $[5\text{-HT}_{1A}+5\text{-HT}_7]\text{-R}$ überprüft und im Vergleich dazu an sechs Oozyten ($n = 6$), in denen kein 5-HT_7 exprimiert wurde. Als Agonistenkonzentrationen wurden 100 nM und 500 nM 5-HT verwendet, wobei die Messungen in Form von Langzeitableitungen erfolgten, die etwa 10 Minuten dauerten. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte allerdings lediglich kleine Schwankungen, so dass im Rahmen dieses Versuchs gezeigt werden konnte, dass keine Desensibilisierung stattfindet, die Aktivierbarkeit des Rezeptor – Kanal – Systems also auch bei mehrmaligem Einwaschen des Agonisten erhalten bleibt (Abb. 14).

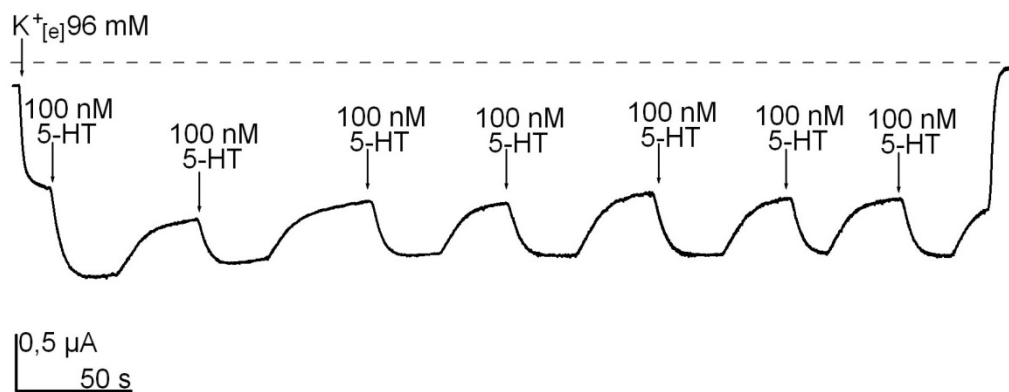


Abb. 14: Überprüfung der Desensitierung der 5-HT Wirkung

Dargestellt ist eine Langzeitableitung der heterodimeren Koexpression $[5\text{-HT}_{1A}+5\text{-HT}_7]\text{-R}$. Dabei wurde mehrmals in Folge 5-HT in der Konzentration 100 nM appliziert. Die Stromantworten auf die wiederholte Gabe des Agonisten zeigen keine Veränderung in der Stromamplitude des GIRK- Stroms. Das Haltepotenzial betrug -70 mV bei 2 mM K^+ Badlösung.

3.2.4 Expressionsanalyse des GIRK 1/2 Kanals mittels Fluoreszenzmessungen

3.2.4.1 *Heterologe Expression von GFP- GIRK 1/2 in Kombination mit [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R*

Ein weiterer Ansatz ist die Überlegung, ob die Heterodimerisierung bewirken könnte, dass weniger GIRK 1/2 Protein synthetisiert wird oder zumindest weniger GIRK 1/2 Kanäle in die Zellmembran gelangen bzw. funktionsfähig integriert werden. Dies hätte zur Folge, dass der maximal mögliche K⁺- Fluss der Zelle und damit korrelierend der messbare Strom reduziert wäre. Hierzu wurde ein fluoreszenztechnisches Messverfahren verwendet unter Einsatz speziell fluoreszenzmarkierter cRNA des GIRK 1/2 Kanals.

Hierzu wurde molekularbiologisch ein spezieller Klon des GIRK 1/2- Kanals hergestellt, der an seinem N- Terminus über eine fluoreszierende Markerstruktur, ein so genanntes GFP- Markerprotein verfügt.

Um die Funktionsfähigkeit dieses Konstruktes zu überprüfen, wurden elektrophysiologische Kontrollmessungen vorgenommen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die heterologe Expression des GFP- GIRK 1/2 in *Xenopus laevis* Oozyten die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals im Vergleich zu solchen Oozyten, in denen die native GIRK 1/2- cRNA exprimiert wurde, nicht verändert. Damit konnte sichergestellt werden, dass die anschließenden Fluoreszenzmessungen nicht durch technische Fehler in der Expression verfälscht werden. Diese Kontrollmessungen entsprachen in ihrem Aufbau den *Voltage Clamp* Messungen, welche auch in anderen Experimenten der vorliegenden Arbeit Anwendung fanden. Das heißt, es wurden Langzeitableitungen durchgeführt an je drei Oozyten (n = 3) folgender Oozytengruppen: 1) GFP – GIRK 1/2 und 5-HT_{1A} 2) GFP – GIRK 1/2, [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R sowie 3) GIRK 1/2 und 5-HT_{1A} als Kontrolle. Als Agonist der *Voltage Clamp* Messungen diente Serotonin in den Konzentrationen 100 nM und 500 nM.

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten an dem speziellen konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 5 Pascal). Hier wurden zunächst die Fluoreszenzeigenschaften des hergestellten Klons überprüft, wobei gezeigt werden konnte, dass das hergestellte Konstrukt GFP- GIRK 1/2 in die Zellmembran transportiert wird und somit nachweisbar ist (Abb. 15).

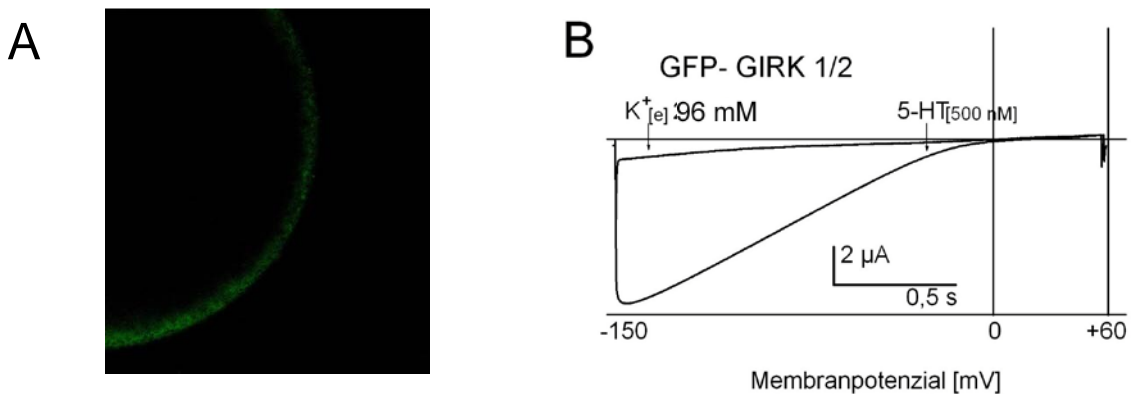


Abb. 15: Fluoreszenzmessung an GFP- GIRK 1/2

(A) Ausschnitt einer *Xenopus laevis* Oozyte, die mit cRNA von GFP- GIRK 1/2 und 5-HT_{1A} Rezeptor- cRNA versehen wurde. Die Fluoreszenz wurde mithilfe des LSM 5 Pascal Fluoreszenzmikroskops vermessen. (B) Ganzzellaufleitung an einer *Xenopus laevis* Oozyte, der unter (A) genannten Konfiguration (GFP- GIRK 1/2 – 5-HT_{1A}). Dargestellt ist eine originale Spannungsrampe, welche in ihren elektrophysiologischen Kenngrößen, denen der nicht GFP-markierten GIRK 1/2 Kanäle entspricht.

Direkt verglichen wurden im Rahmen der Fluoreszenzmessungen drei verschiedene heterologe Expressionen: Oozyten mit [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R, solche mit [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK und 5-HT_{2C} sowie die Kontrolle ([5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK und H₂O). Die Kombination mit dem 5-HT_{2C} Rezeptor wurde zusätzlich gemessen, um eine zweite Kontrolle zu haben, um also Effekte nachzuweisen, die mit dem injizierten Wasser bei der Kontrolle zu erklären wären.

Die angewandte Fluoreszenzmessmethode diente demgemäß primär einer direkten quantitativen Beurteilung der Expression der verschiedenen injizierten Oozyten. Problematisch war dabei der Umstand, dass die Sensitivität des Verfahrens nicht sehr hoch ist.

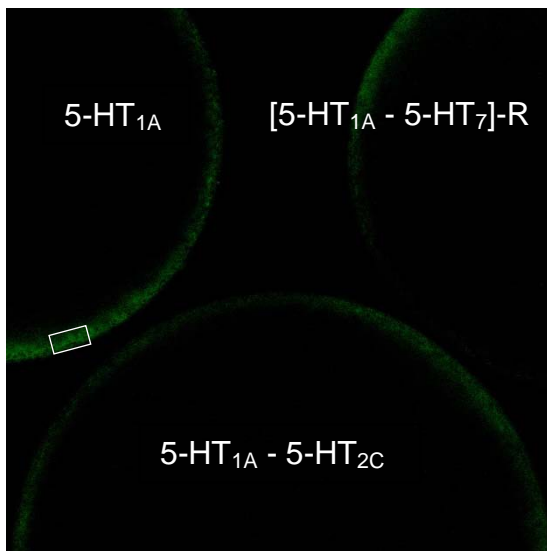
Zudem sind Unterschiede in Intensität der Fluoreszenz respektive in der Expression des Kanalproteins erst ab einem Unterschied von etwa 40 % der Leuchtkraft unter dem LSM sicher zu erkennen, weshalb bei der Auswertung ein spezielles Grafikprogramm zum Einsatz kam, um auch geringere Unterschiede gegebenenfalls zu identifizieren (siehe Material und Methoden).

3.2.4.2 ***Untersuchung der Fluoreszenz von 5-HT_{1A} – GFP- GIRK 1/2 und [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R – GFP- GIRK 1/2***

Zur Messung wurden die injizierten Oozyten auf einem Objektträger angeordnet, der über eine Vertiefung verfügte, die mit 2 mM K⁺- Badlösung angefüllt war. Anschließend wurde der Träger in das Mikroskop eingesetzt. Nachdem der verwendete Fluoreszenzmarker GFP über Grünfluoreszenz verfügte, deren Wellenlänge im Bereich von etwa 500 – 550 nm liegt, wurde entsprechend dieser Bereich durch das Mikroskop aufgenommen und grafisch mittels einer speziellen Software an dem PC dargestellt, der mit dem Mikroskop verbundenen war.

Dabei konnte an allen untersuchten Proben festgestellt werden, dass kein evidenter Unterschied in der Leuchtintensität nachweisbar ist, was mittels relativer Werte quantifiziert werden konnte. Die Oozyten mit der exprimierten RNA von [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R leuchteten ebenso intensiv ($47,42 \pm 6,46$) wie die Kontrolle (GFP- GIRK 1/2, 5-HT_{1A} und H₂O) ($52,45 \pm 16,96$) und auch wie die Probe mit der Koexpression des 5-HT_{2C} Rezeptors ($46,87 \pm 20,65$) (Abb. 16).

A



B

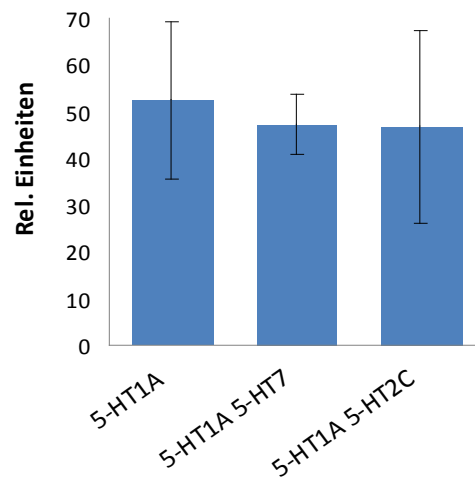


Abb. 16: Vergleich der Intensität der Membranfluoreszenz von GFP- GIRK 1/2 bei unterschiedlichen GPCR- Koexpressionen

(A) Gezeigt sind Ausschnitte der *Xenopus laevis* Oozyten, in welche die cRNA von GFP- GIRK 1/2 zusammen mit dem Rezeptor 5-HT_{1A} bzw. [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R oder 5-HT_{2C} injiziert wurde. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann die Lokalisierung der GIRK- Kanäle durch die detektierte Fluoreszenz ermittelt werden. Das weiße Rechteck markiert die Fläche, die für die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität verwendet wurde. Die Größe dieses Rechtecks wurde bei der kompletten Auswertung konstant gehalten. (B) Quantifizierung der Membranfluoreszenz von GFP- GIRK 1/2 zusammen mit den unterschiedlichen Rezeptorkoexpressionen bzw. der Kontrolle GFP- GIRK 1/2 – 5-HT_{1A} anhand eines Balkendiagramms. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) der normalisierten Daten an.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Kanalexpression von GIRK 1/2 nicht durch die Heterodimerisierung von [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R beeinflusst wird. Das heißt, auch bei Koexpression von 5-HT₇ ist in der Zellmembran der untersuchten Oozyten die gleiche Menge an Kanalprotein nachzuweisen wie bei der homomeren Expression von 5-HT_{1A}.

Die Reduktion der Stromamplitude muss demnach über andere Mechanismen vermittelt sein, so dass eine zweite Möglichkeit der Regulation des Stromflusses in Betracht gezogen werden muss: Die Öffnung der GIRK Kanäle durch die Aktivierung des Serotoninrezeptors wird über die $\beta\gamma$ -Untereinheit des

G- Proteins reguliert. Eine Reduktion bzw. Inhibierung dieser Untereinheit führt somit zu einer Reduktion des messbaren Kanalstroms.

3.3 Koexpression von 5-HT_{1A} zu [5-HT₇ – TASK-1]-SK

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Koexpression von 5-HT₇ zu dem Rezeptor – Kanalkomplex [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK einen signifikanten Einfluss auf die an GIRK 1/2 gemessene Stromamplitude besitzt, wurde versucht, in weiteren Experimenten, die Mechanismen dieses Effekts näher zu untersuchen. Nun soll geprüft werden, ob die Koexpression von 5-HT_{1A} zu [5-HT₇ – TASK-1]-SK die gleiche Reduktion der Stromamplitude bei TASK-1 ergibt wie in der Anordnung 5-HT₇ zu dem System [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK. Das heißt, als Basissystem dient nun der 5-HT₇ Rezeptor in Verbindung mit einem TASK Kanal.

Nachdem bisher keine Versuche zu [5-HT₇ – TASK-1]-SK vorliegen, stellt die Untersuchung dieses Systems den Basisversuch hierfür dar. Auf diese Weise sollen zum einen die physiologischen Eigenschaften dieses Systems untersucht werden, zum anderen soll eine Referenzgruppe generiert werden.

Interessant ist hierbei zudem die Tatsache, dass bislang die Signaltransduktion des 5-HT₇ Rezeptors nicht geklärt ist, so dass in diesem Zusammenhang ein weiteres Vergleichsexperiment erfolgen soll, wobei der TASK-1 Kanal an einen weiteren GPCR, den β 1- Rezeptor, gekoppelt werden soll, dessen Signaltransduktion über ein G_s- Protein bekannt ist.

3.3.1 Funktionelle Charakterisierung des 5-HT₇ Rezeptors

3.3.1.1 **Elektrophysiologische Messungen an [5-HT₇– TASK-1]-SK**

Wie in der Einleitung dargestellt wurde, wird für die Signaltransduktion des 5-HT₇ Rezeptors sowohl eine Verbindung zu einem heterotrimeren G_{q/11}- Protein wie auch zu einem G_s- Protein diskutiert. Darüber hinaus gibt es auch Hinweise darauf, dass, ähnlich wie bei der Kombination Kir3- G_{i/o}, eine direkte Interaktion zwischen Effektor- und G-Protein existiert (Chen et al., 2006).

Als Effektorprotein diente deshalb der TASK-1 Kanal, der über ein G- Protein reguliert wird. Die Charakterisierung erfolgte somit an dem heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten System [5-HT₇– TASK-1]-SK.

Die Zellströme wurden mit dem *Voltage Clamp* Verfahren gemessen, wobei die TASK-1- Kanalaktivität in Abhängigkeit der Zellmembranspannung und der extrazellulären K⁺- Konzentration überprüft wurde; als Badlösung diente 2 mM K⁺- Lösung. Die Überprüfung der Kopplung des TASK-1- Basalstroms an das G- Protein bzw. den 5-HT₇ Rezeptor erfolgte mit 5-Carboxamidotryptamin (5-CT), wobei die Stimulierung mit dem Agonisten eine Inhibierung des Kanalstroms bewirkte; das heißt der messbare K⁺- Strom wurde mit zunehmenden 5-CT- Konzentrationen kleiner. Bei 5-CT handelt es sich analog zu Serotonin um einen Agonisten für Serotoninrezeptoren. Für die Versuche wurden folgende 5-CT- Konzentrationen verwendet: 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 100 nM. Als Maximalwert für die Agonisten induzierte Inhibierung konnte 500 nM 5-CT ermittelt werden. Zusätzlich wurde eine 2 mM K⁺- Lösung mit einem pH- Wert von 4,5 genutzt, um zu verifizieren, dass es sich bei den gemessenen Strömen tatsächlich um 5-CT induzierte TASK- Ströme handelt. Bekanntermaßen sind die TASK- Kanäle äußerst sensitiv für Änderungen des extrazellulären pH- Wertes, was sich in einer starken Inhibition des Kanalstroms widerspiegelte.

Die Messungen erfolgten in zehnmütigen Ableitungen, wobei ein Protokoll verwendet wurde, bei dem die Oozyten auf ein Haltepotenzial von -70 mV

geklemmt wurden. In Abständen von 3 s wurde die Membran ausgehend vom Haltepotenzial für die Dauer von 200 ms auf +30 mV depolarisiert und der bei diesem Membranpotenzial über die Zeit ableitbare Strom aufgezeichnet.

Primär sollte eine Dosis-/Wirkungsbeziehung ermittelt werden, um eine quantitative Aussage über die Kanal- bzw. Rezeptoraktivität bei [5-HT₇ – TASK-1]-SK machen zu können. Hierzu wurden obig genannte 5-CT- Konzentrationen appliziert, wobei die Gesamtzahl der gemessenen Oozyten 22 betrug. Pro Oozyte wurden dabei maximal 3 verschiedene Konzentrationen an 5-CT sowie die Maximalkonzentration, 500 nM, appliziert, abschließend wurde die 2 mM K⁺- Lösung mit pH 4,5 eingewaschen.

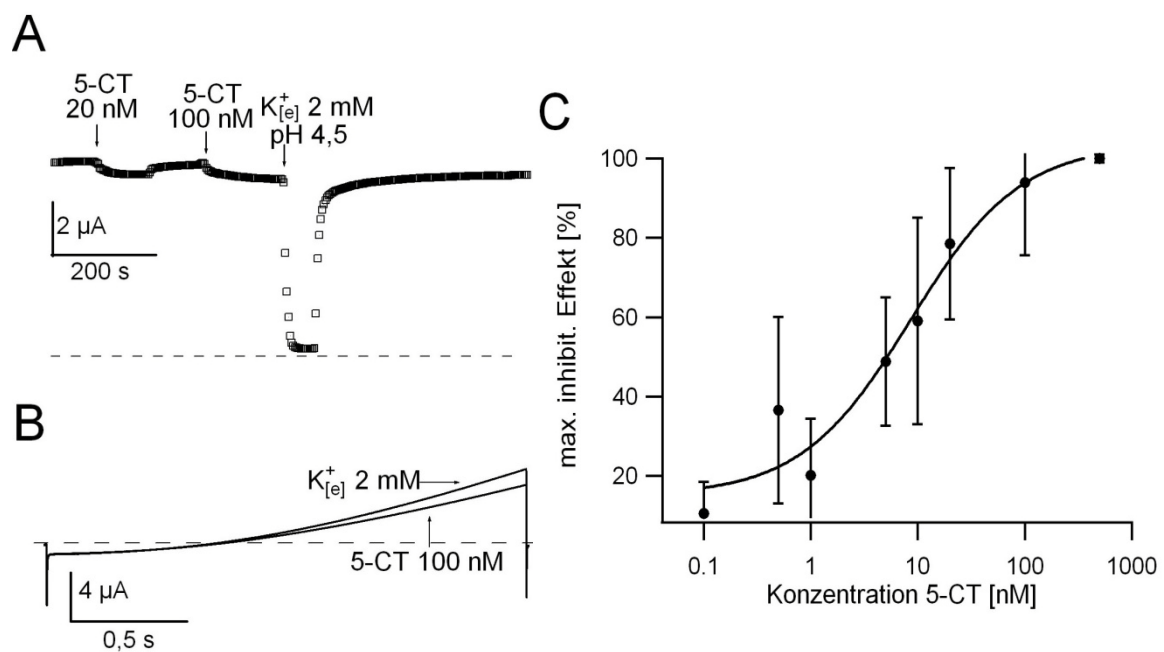


Abb. 17: Basal- und rezeptorinduzierter Strom des Expressionssystems [5-HT₇ – TASK-1]-SK

Ganzzelleableitungen von *Xenopus laevis* Oozyten, in denen [5-HT₇ – TASK-1]-SK koexprimiert wurde. (A) Stromableitung mithilfe des „Many-Jumps“- Protokolls bei einer äußeren K⁺- Konzentration von 2 mM. Die Applikation von 5-CT in den Konzentrationen 20 nM und 100 nM zeigt eine Reduktion des TASK- Kanalstroms. Die Änderung des pH- Wertes auf 4,5 zeigt eine deutliche Reduktion des pH- sensitiven TASK- Stroms. (B) Die Spannungsrampe (-150 mV bis +60 mV, bei 2 mM K⁺- Badlösung) zeigt gleichermaßen die Reduktion des Stromflusses bei Applikation von 20 nM 5-CT- Lösung. (C) Dosis-/Wirkungskurve für unterschiedliche 5-CT Konzentrationen. Die Messpunkte wurden durch eine Hill- Gleichung angepasst. Dargestellt sind Mittelwerte aus 8 unabhängigen Messungen.

Die Dosis-/Wirkungskurve (Abb. 17) ergab eine halbmaximale Kanalinhibierung bei einer Konzentration von 5-CT von $8,56 \pm 4,24$ nM. Die Betrachtung der Messergebnisse zeigte, dass im Mittel ein TASK-1 Basalstrom von $6,17 \pm 0,57$ μ A vorhanden war in 2 mM K^+ - Badlösung. Des Weiteren wurde durch Applikation von 5-CT im Mittel eine maximale Inhibierung von $1,03 \pm 0,26$ μ A, entsprechend $16,33 \pm 3,07$ % des Maximalstroms, erreicht ($n = 19$), wobei eine Reduktion dieser Größenordnung, insbesondere Unterschiede, technisch schwierig zu messen sind.

Mittels der pH- Kontrolle konnte jedoch belegt werden, dass es sich bei den gemessenen Strömen um TASK-1 Ströme handelte. Durch Auswaschen des Agonisten konnte wiederum das Niveau des Basalstroms erreicht werden.

Um den Einfluss der extrazellulären K^+ - und 5-CT Konzentration sowie des pH- Wertes der Kaliumlösung zu messen, wurden die Stromantworten auf applizierte Spannungsrampen an den Oozyten untersucht. Für diese Messungen wurde das Zellmembranpotenzial innerhalb von 2 s kontinuierlich von -150 mV auf +60 mV variiert und der dabei gemessene Strom in Abhängigkeit der K^+ - Konzentration des Badmediums dargestellt (Abb. 17).

Bei Hyperpolarisation der Zellmembran wurde ein sofort einsetzender, Auswärtsstrom induziert. Unter depolarisierenden Bedingungen konnten positiv vom K^+ - Umkehrpotenzial Auswärtsströme beobachtet werden, wobei die Amplitude der Ströme unter Zugabe von 5-CT und bei einem pH- Wert von 4,5 geringer wurde. Als Badlösung diente wiederum 2 mM K^+ - Lösung, die Inhibierung erfolgte mit 100 nM und 500 nM 5-CT. Die Betrachtung der Aktivierung der Spannungsrampen zeigte hierbei das Verhalten, das für K_2P - K^+ - Kanäle erwartet wird: Die Ströme setzten ohne Verzögerung ein. Bei den gegebenen Bedingungen einer hohen intrazellulären K^+ - Konzentration in den *Xenopus laevis* Oozyten und einer niedrigen K^+ - Konzentration im Bad (2 mM) kam es zu einem Auswärtsstrom, der deutlich größer war, als der Einwärtsstrom (Abb. 17).

Mittels dieser Ergebnisse in Verbindung mit der starken Inhibierung der Ströme durch eine Erniedrigung des extrazellulären pH- Wertes auf 4,5 konnte

nachgewiesen werden, dass die gemessenen Ströme TASK-1 vermittelt sind. Das bedeutet, es lässt sich eine elektrophysiologisch messbare Interaktion zwischen 5-HT₇ und TASK-1 nachweisen, wobei die Aktivität von TASK-1 durch die Aktivierung des 5-HT₇ Rezeptors mittels dessen Agonisten reguliert wird.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass erhöhte 5-CT Konzentrationen inhibitorische Effekte auf TASK-1 haben, so dass diese übereinstimmenden Eigenschaften der Basal- und Agonistenströme nahe legen, dass beide Ströme den gleichen Kanal, nämlich TASK-1, benutzen.

Schließlich konnte gezeigt werden, dass sowohl das Membranpotential wie auch die Kaliumkonzentration einen großen Einfluss auf die TASK-Kanalströme haben.

3.3.1.2 **Vergleich der Expressionssysteme [5-HT₇ – TASK-1]-SK und β 1 – TASK-1**

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Vergleichsexperiment zur Untersuchung der Signaltransduktion durchgeführt. Hierzu wurde der G_s-Protein gekoppelte TASK-1 Kanal mit einem weiteren GPCR exprimiert, dem β 1- adrenergen Rezeptor. Dieser wurde aus zwei Gründen gewählt. Zum einen ist dessen Signaltransduktion über ein G_s- Protein bekannt, zum anderen konnte bereits dessen Koexistenz in Säugergewebe nachgewiesen werden, in denen auch TASK-1 exprimiert ist (Duprat et al., 1997), so dass die Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen den beiden Proteinen einen weiteren interessanten Punkt in diesem Zusammenhang darstellt, auch im Hinblick auf einen quantitativen und qualitativen Vergleich mit [5-HT₇ – TASK-1]-SK.

Am Versuchsaufbau selbst wurde nichts verändert, um die Bedingungen identisch zu gestalten. Entsprechend wurde die cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten heterolog exprimiert und mittels *Voltage Clamp* Verfahren gemessen. Die Überprüfung der Kopplung des TASK-1- Kanals an das G_s- Protein bzw. den β 1- Rezeptor erfolgte durch Applikation von Isoprenalin als adrenergem

Agonist. Wie schon bei [5-HT₇ – TASK-1]-SK bewirkte auch die Kopplung des β 1- Rezeptor an G_s einen Anstieg von cAMP, was wiederum eine Inhibierung des Kanalstroms zur Folge hatte. Mit steigenden Isoprenalinkonzentrationen wurde der messbare Kanalstrom geringer. Verwendet wurden folgende Isoprenalinkonzentrationen: 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 300 nM, 500 nM und 700 nM. Als inhibitorischer Maximalwert konnte 1000 nM (entsprechend 1 μ M) ermittelt werden. Anzumerken ist, dass es in der Versuchsgruppe Oozyten gab, bei denen die maximale Inhibition erst bei 2 μ M erreicht wurde. Nachdem dies aber nur für 5 Oozyten (n = 5) bei n_{gesamt} = 39 nachzuweisen gewesen war, wurden diese nicht in die Auswertung einbezogen. Zusätzlich wurde auch hier eine 2 mM K⁺- Lösung mit einem pH- Wert von 4,5 eingewaschen, um zu verifizieren, dass es sich bei den gemessenen Strömen tatsächlich um Isoprenalin induzierte TASK- Ströme handelte.

Die Messungen wurden nach dem gleichen Schema konzipiert wie im Parallelversuch [5-HT₇ – TASK-1]-SK. Die Ermittlung der Dosis-/Wirkungskurve zeigte, dass eine halbmaximale Inhibition des Kanalstroms bei einer Konzentration von $54,85 \pm 8,84$ nM Isoprenalin vorliegt (Abb. 18).

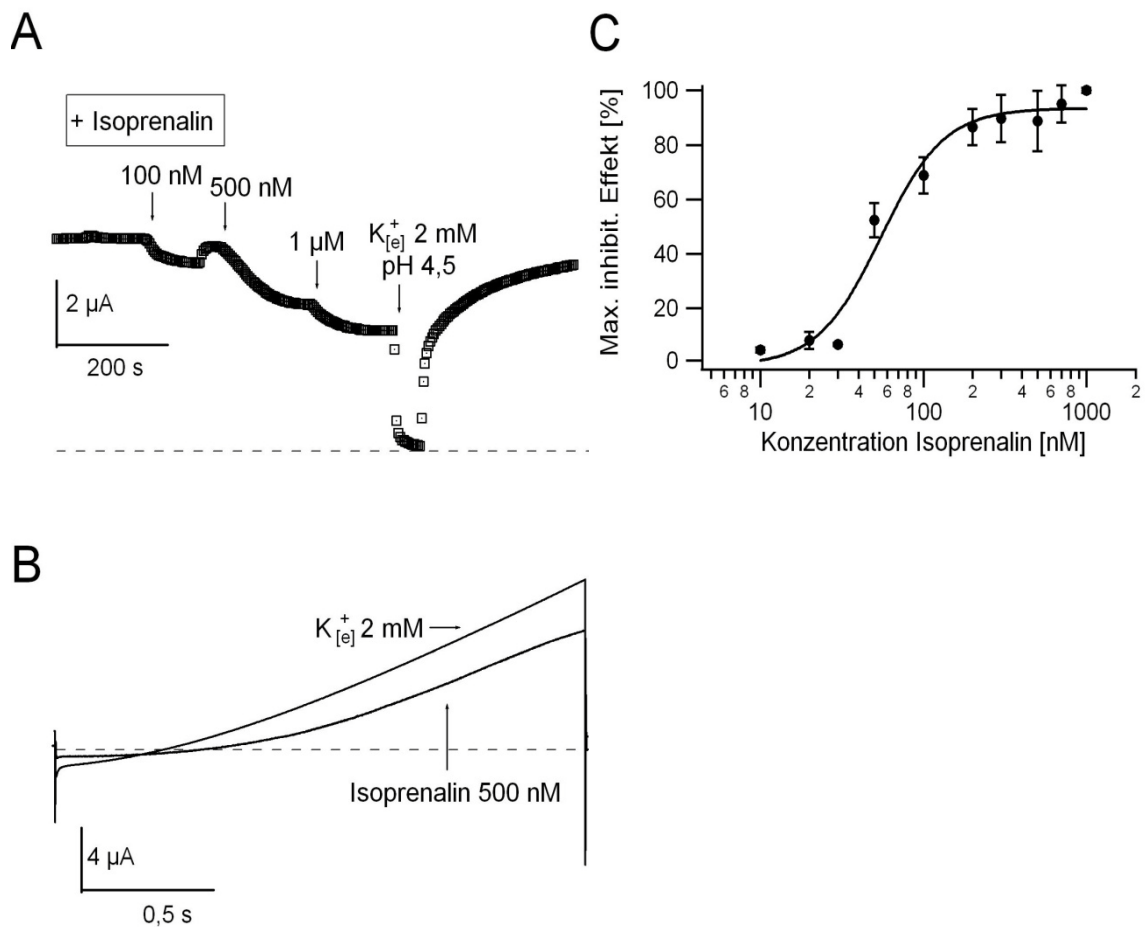


Abb. 18: Effekte von Isoprenalin auf TASK-1 – β 1

Ganzzelleableitungen von *Xenopus laevis* Oozyten, in denen TASK-1 und β 1 koexprimiert wurde. (A) Analog zu den Messungen an [5-HT₇ – TASK-1]-SK: Stromableitung mittels „Many Jump“- Protokoll bei einer äußeren K⁺- Konzentration von 2 mM. Reduktion des Stromflusses nach Applikation von Isoprenalin in den Konzentrationen 100 nM und 500 nM. Elektrophysiologischer Nachweis des TASK- Stroms mithilfe der pH- Wert Änderung auf 4,5: Signifikante Stromreduktion. (B) Die Spannungsrampe (-150 mV bis +60 mV, bei 2 mM K⁺- Badlösung) zeigt gleichermaßen die Reduktion des Stromflusses bei Applikation von 500 nM Isoprenalinlösung. (C) Dosis-/Wirkungskurve für unterschiedliche Isoprenalinkonzentrationen. Anpassung der Messpunkte durch eine Hill- Gleichung. Ausgewertet wurden 10 unabhängige Messungen.

Der Vergleich verschiedener Parameter mit dem Parallelexperiment ([5-HT₇ – TASK-1]-SK) erbrachte nun folgende Ergebnisse. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die maximale inhibitorische Agonistenkonzentration bei dem Versuch mit dem 5-HT₇ Rezeptor bei 500nM lag, während sie unter Inhibierung mit dem β 1 Rezeptor bei 1000 nM lag. Zudem zeigt der Vergleich der Werte der

halbmaximalen Inhibierung, dass dieser bei der Versuchsanordnung [5-HT₇ – TASK-1]-SK deutlich geringer ausfällt als bei der Anordnung TASK-1 – β1: Hier sind zur halbmaximalen Inhibition des TASK-1 Stroms $54,85 \pm 8,84$ nM des Agonisten (Isoprenalin) notwendig, bei [5-HT₇ – TASK-1]-SK hingegen liegt dieser bei $8,56 \pm 4,24$ nM (5-CT).

Die quantitative Gegenüberstellung der gemessenen Ströme ergab folgende Ergebnisse: Der TASK-1 Basalstrom betrug bei der Koexpression mit dem β1 Rezeptor (n = 39) im Mittel $5,42 \pm 0,4$ μA, bei der Koexpression mit dem 5-HT₇ Rezeptor waren es $6,19 \pm 0,57$ μA (n = 19), jeweils in 2 mM K⁺- Badlösung. Dieser Unterschied ist nicht signifikant. Im Gegensatz dazu konnte der Vergleich der Inhibition einen signifikanten Unterschied beweisen. Verglichen wurde dabei der Mittelwert der Inhibition der Maximalwerte, also bei 1 μM Isoprenalin (β1 Rezeptor) bzw. 500 nM 5-CT (5-HT₇ Rezeptor). Für die Expression von TASK-1 und β1 Rezeptor wurde eine mittlere maximale Inhibierung von $1,50 \pm 0,15$ μA ermittelt werden, was $29,36 \pm 2,55$ % des Maximalstroms entspricht (n = 39). Für das System [5-HT₇ – TASK-1]-SK konnte lediglich eine mittlere maximale Inhibierung von $1,03 \pm 0,26$ μA, entsprechend $16,33 \pm 3,07$ % des Maximalstroms (n = 18), nachgewiesen werden. Die Signifikanztestung ergab für p = 0,0037. Die Differenz in der Stromamplitude ist somit hoch signifikant. Auf die Applikation von 2 mM K⁺-Lösung mit einem pH- Wert von 4,5 reagierten beide Signalkomplexe gleichermaßen, was den Schluss zulässt, dass auch hier die gemessenen Effekte auf die Aktivität des TASK-1 Kanals zurückzuführen sind.

Es konnte zudem beobachtet werden, dass zwischen den beiden TASK-1 Koexpressionen Unterschiede bestehen, was die Verwertbarkeit der Oozyten bzw. die Qualität der elektrophysiologischen Messungen betrifft. So belief sich die Zahl der Oozyten, in denen lediglich eine maximale Inhibierung des TASK-Stroms von weniger als 10 % des Basalstroms gemessen werden konnte bei der Expression des β1 Rezeptors auf n = 4, bei n_{gesamt} = 39, entsprechend 10,25 % der gemessenen Oozyten. Bei den Oozyten mit dem 5-HT₇ Rezeptor traf dies für n = 7 zu (n_{gesamt} = 19), das heißt für 36,84 %. In den übrigen Oozyten war eine maximale Inhibierung > 10 % des Basalstroms zu messen.

Des Weiteren konnte im Verlauf der Inkubation zur Expression der cRNA an verschiedenen Präparationen von *Xenopus laevis* Oozyten beobachtet werden, dass deutlich mehr Oozyten der Präparation mit TASK-1 und dem 5-HT₇ Rezeptor zugrunde gingen, als solche mit dem β 1 Rezeptor. Ein weiterer evidenten Faktor war die teilweise erheblich erschwerte Auswaschbarkeit des Agonisten induzierten Stromes bei ersteren Oozyten.

Zudem fanden auch hier neben obig beschriebenen Ableitungen Spannungsrampen Anwendung, um die Stromantworten auf unterschiedliche extrazelluläre K⁺- und Isoprenalin Konzentration sowie den pH- Wert der Kaliumlösung zu messen. Ihr Protokoll glich denen, die auch bei [5-HT₇ – TASK-1]-SK zum Einsatz kamen.

Die Betrachtung der Aktivierungskinetik offenbarte wiederum bei Hyperpolarisation der Zellmembran einen sofort einsetzenden, schwachen einwärtsgerichteten Strom. Unter depolarisierenden Bedingungen konnten positiv vom K⁺- Umkehrpotenzial Außwärtsströme beobachtet werden, wobei die Amplitude der Ströme unter Zugabe von Isoprenalin und bei einem pH- Wert von 4,5 geringer wurde. Die Inhibierung erfolgte mit 100 nM und 500 nM Isoprenalin. Die obig beschriebenen signifikanten Unterschiede in der Stromamplitude, konnten erwartungsgemäß auch im Verlauf der Spannungskurven nachvollzogen werden.

Die Kinetik stimmte dennoch in beiden Versuchen überein, womit demonstriert werden konnte, dass die Ströme, die in den beiden Experimenten gemessen wurden, TASK-1 zugeordnet werden können. Demnach sind die gemessenen Differenzen in der Stromamplitude auf Unterschiede in den Signalkomplexen [5-HT₇ – TASK-1]-SK bzw. TASK-1 – β 1 Rezeptor selbst zurückzuführen.

3.3.2 Untersuchung des Expressionssystems [5-HT₇ – TASK-1]-SK bei der Koexpression von 5-HT_{1A}

Nach der eingehenden Untersuchung des 5-HT₇ Rezeptors erfolgte nun abschließend die Untersuchung des Rezeptorheterodimers [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R in

umgekehrter Anordnung, also mit [5-HT₇ – TASK-1]-SK als Signalkomplex mit der Koexpression von 5-HT_{1A}.

Die heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten erfolgte in Form von zwei Ansätzen. Zum einen wurde TASK-1 mit [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R eingebracht, zum anderen [5-HT₇ – TASK-1]-SK ohne 5-HT_{1A} als Kontrolle. Hier wurde wiederum H₂O ergänzend injiziert, um äquivalente RNA Mengen in den Oozyten zu gewährleisten.

Die Versuchsanordnung wurde identisch zu jener bei der Untersuchung des 5-HT₇ Rezeptors gewählt, als Agonist diente 5-CT. Die Inhibition des Kanalstroms durch den Agonisten 5-CT erfolgte mittels dreier Konzentrationen: 100 nM, 500 nM und 1 µM, wobei letztere Konzentration, die oberhalb des ermittelten Maximalwertes für die Inhibition von TASK-1 durch 5-HT₇ liegt, gewählt wurde, um gegebenenfalls nachweisen zu können, dass die Koexpression von 5-HT_{1A} den Effekt auf die Inhibition von TASK-1 steigert.

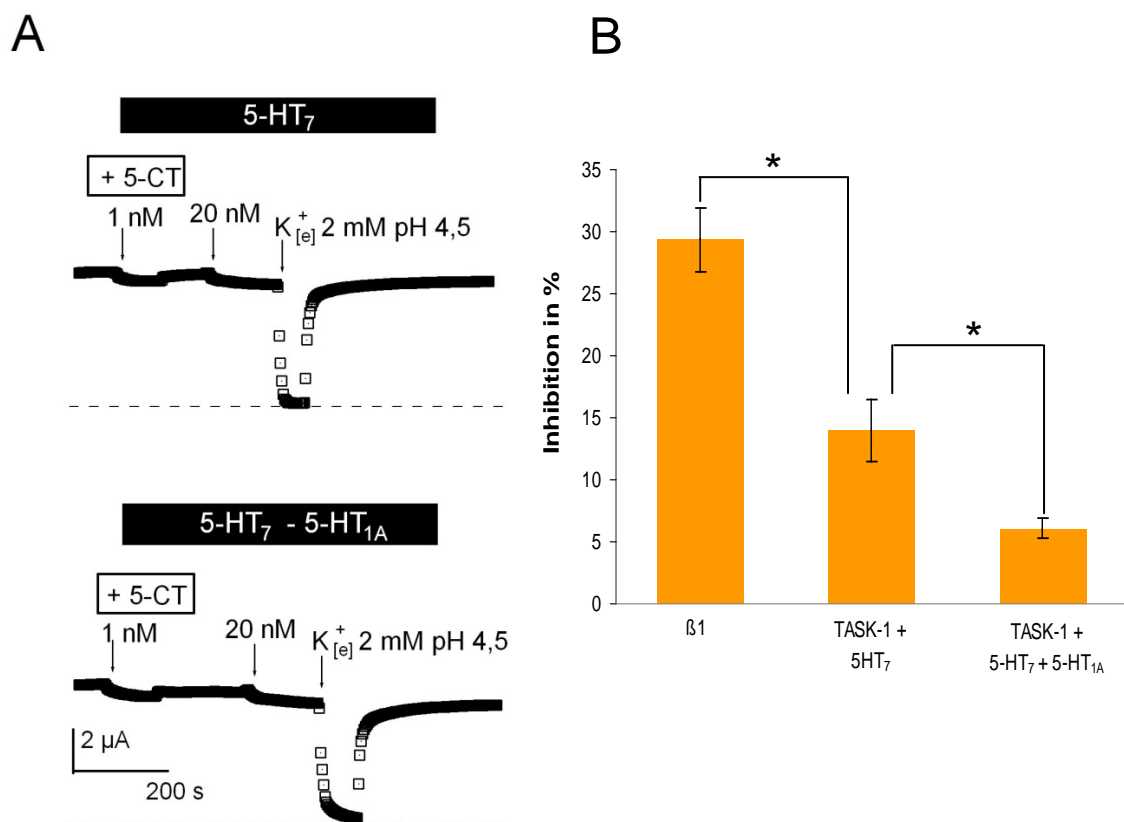


Abb. 19: Inhibition des TASK-1 Stroms durch Koexpression von 5-HT_{1A} zu [5-HT₇ – TASK-1]-SK

5-HT_{1A} cRNA wurde zusammen mit TASK-1- und 5-HT₇- cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten heterolog exprimiert. (A) zeigt den Vergleich der heteromeren Koexpression von dem 5-HT_{1A} Rezeptor zu [5-HT₇ – TASK-1]-SK und der Kontrolle, in welcher nur [5-HT₇ – TASK-1]-SK monomer exprimiert wurde. Dargestellt ist jeweils der Messverlauf einer originalen „Many jump“-Ableitung. Das Haltepotenzial lag bei -70 mV, die Oozyten wurden zur Messung in Abständen von 3 s für die Dauer von 200 ms auf +30 mV depolarisiert, die extrazelluläre K⁺- Konzentration betrug 2 mM. Dargestellt ist die Reduktion des TASK-1 Stromflusses bei Applikation von 5-CT in den Konzentrationen 1 nM und 20 nM. Zudem zeigt die Änderung des pH- Wertes auf 4,5 eine deutliche Reduktion des pH- sensitiven TASK- Stroms. Die Inhibition ist dabei absolut betrachtet klein. (B) Quantifizierung der Kanalinhibition bei der heterodimeren Anordnung [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R im Vergleich mit der Inhibition bei Expression von TASK-1 und dem 5-HT₇- bzw. β1- Rezeptor. Angabe in Prozent von der Maximalinhibition 100 %. Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung der normalisierten Daten an.

Die Gesamtzahl der gemessenen Oozyten betrug hierbei 15, wobei die Daten des [5-HT₇ – TASK-1]-SK Versuchs in die Auswertung einbezogen wurden, so dass sich für die Kontrollgruppe, in denen [5-HT₇ – TASK-1]-SK exprimiert wurde, n = 24 ergab. In diese Oozyten wurde als dritte Komponente zusätzlich H₂O injiziert, um gleiche Mengen injizierter RNA im Vergleich zu den Oozyten der Versuchsgruppe zu gewährleisten, die mit TASK-1- sowie [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R - RNA inkubiert wurden.

Der Vergleich der Messungen ergab folgende Ergebnisse: Der TASK-1 Basalstrom betrug bei der Koexpression [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R $6,01 \pm 0,24 \mu\text{A}$, bei der Kontrolle [5-HT₇ – TASK-1]-SK $6,13 \pm 0,43 \mu\text{A}$. Hier konnte kein signifikanter Unterschied der Stromamplitude beobachtet werden. Elektrophysiologisch konnte somit gezeigt werden, dass die Koexpression von 5-HT_{1A} zu [5-HT₇ – TASK-1]-SK keinen Einfluss auf den Basalstrom besitzt.

Beim Vergleich der agonistenabhängigen Ströme konnte gezeigt werden, dass die Inhibition signifikante Unterschiede aufweist. Bei der Koexpression von 5-HT₇ und 5-HT_{1A} wurden im Mittel folgende Stromreduktionen bei 500 nM 5-CT abgeleitet: $0,17 \pm 0,29 \pm 0,03 \mu\text{A}$, entsprechend einer mittleren Inhibierung von $4,90 \pm 0,53 \%$ vom TASK-1- Basalstrom (n = 15). Bei der Kontrolle ohne 5-HT_{1A} ergab sich eine Inhibition von $0,86 \pm 0,2 \mu\text{A}$, entsprechend $13,97 \pm 2,49 \%$ vom TASK-1 Strom (n = 24). Die Signifikanzprüfung mittels t-Test konnte zeigen, dass der Unterschied in der Stromamplitude Signifikanzniveau erreicht (p = 0,01). Um die maximale prozentuale Inhibition des TASK Stroms der beiden

einzelnen Koexpression zu vergleichen, wurde der Mittelwert der Inhibition bei maximal wirksamer Agonistenkonzentration gebildet: Bei [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R betrug der Wert $6,05 \pm 0,82$ % ([1 μ M 5-CT]), bei [5-HT₇ – TASK-1]-SK ergab sich eine Inhibition von $13,97 \pm 2,49$ % ([500 nM 5-CT]). Diese Werte wurden zudem mit den Ergebnissen des Vorversuches, der Inhibierung von TASK-1 – β 1 durch Isoprenalin verglichen, um auch hier auf Signifikanz zu prüfen (vgl. Kap. 3.3.1.2). Hier wurde eine maximale Inhibierung von $29,36 \pm 2,55$ % ([1 μ M Isoprenalin]) erreicht. Diese Werte sind in Abbildung 19 dargestellt.

Diese Ergebnisse lassen somit die Aussage zu, dass die Koexpression von [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R eine Reduktion der Stromamplitude, also eine Verringerung der inhibitorischen Wirkung, zur Folge hat.

Zusätzlich fanden Ableitungen mittels Spannungsrampen Anwendung, um die Stromantworten auf unterschiedliche extrazelluläre K⁺- und 5-CT Konzentration sowie den pH- Wert der Kaliumlösung zu messen. Die Betrachtung der Kinetik offenbarte wiederum bei Hyperpolarisation der Zellmembran einen sofort einsetzenden, schwachen einwärtsgerichteten Strom. Unter depolarisierenden Bedingungen konnten positiv vom K⁺- Umkehrpotenzial Auswärtsströme beobachtet werden, wobei die Amplitude der Ströme unter Zugabe von 5-CT und bei einem pH- Wert von 4,5 geringer wurde. Als Badlösung diente wiederum 2 mM K⁺- Lösung, die Inhibierung erfolgte mit 100 nM und 500 nM 5-CT. Unterschiede in der Stromamplitude konnten zwar nachgewiesen werden, ihre Interpretation erfolgt aber unter den gleichen Vorbehalten wie oben dargestellt. Dennoch konnte mittels des Vergleichs der Kinetik der Ströme gezeigt werden, dass in beiden Fällen ein TASK-1 Strom vorliegt.

4 Diskussion

G- Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) besitzen für die Zelle eine elementare Bedeutung, da sie das Bindeglied zwischen intra- und extrazellulärem Raum darstellen. Extrazelluläre Botenstoffe in Form spezifischer Liganden können an die Rezeptoren binden, wodurch mithilfe von G- Proteinen Signalkaskaden in Gang gesetzt werden, in deren Folge zelluläre Prozesse aktiviert, inhibiert oder moduliert werden. Die GPCR gehören zur Rezeptorgruppe der 7- Helix- Rezeptoren.

Die Bedeutung von Rezeptoren für biologische Zellen hat dazu geführt, dass in den letzten Jahrzehnten intensiv an Struktur, Funktionsweise und Eigenschaften der Rezeptoren geforscht wurde. So wurde auch die Theorie aufgestellt, dass GPCRs *in vivo* nicht nur als Monomere, sondern auch als Dimere existieren, und dabei nicht zwingend eine homomere, sondern auch eine heteromere Struktur aufweisen können. Bewiesen werden konnte dies erstmals am GABA_B- Rezeptor (Marshall et al., 1999b) (Marshall et al., 1999a). Mittels Coimmunpräzipitationsverfahren konnte dies aktuell auch für die Serotoninrezeptoren [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R nachgewiesen werden (Kobe et al., 2008). Die Funktionsweise und Bedeutung dieser Heterodimerisierungen ist jedoch in weiten Bereichen noch unbekannt, so dass in dieser Arbeit die Heterodimerisierung dieser beiden Serotoninrezeptoren im speziellen und davon ausgehend die Heterodimerisierung von GPCRs im allgemeinen untersucht werden sollte.

Hinter dem Streben immer neue biologische und physiologische Zusammenhänge zu erkennen steht ein wesentliches Ziel: Die Erkenntnisse der Forschung für die Medizin und damit für den Menschen nutzbar zu machen, bspw. bei der Entwicklung neuer Medikamente. Aus diesem Grund, sollen abschließend klinische Aspekte thematisiert werden.

4.1 Die Heterodimerisierung von GPCRs

Wie bereits in der Einleitung dargestellt wurde, erscheint eine Einteilung der Heterodimere in „obligate“ und „fakultative“ Heteromere sinnvoll.

Der GABA_B- Rezeptor war der erste Beweis dafür, dass die Heterodimerisierung zweier GABA- Rezeptormonomere obligat für ein funktionierendes Rezeptorprotein ist. Die Dimerisierung erfolgt im Rahmen der Biosynthese im *Endoplasmatischen Reticulum*. Wie bereits dargestellt wurde, ist sie Voraussetzung für die weitere Synthese: „quality control checkpoints“ (Bulenger et al., 2005). Zudem gewährleistet nur die korrekte Heterodimerisierung den Transport und die Expression des Dimers in der Zellmembran (Agnati et al., 2003). In diesem Fall spricht man von konstitutiver Heterodimerisierung, sie geschieht unabhängig von äußeren Faktoren wie der Aktivierung durch Liganden (Issafras et al., 2002).

4.1.1 Die Interaktion zwischen Rezeptor/Rezeptorheterodimer und Ligand

Diese Kriterien sind nicht auf die Gruppe der fakultativen Heterodimere übertragbar. Der wichtigste Unterschied ist hierbei die Tatsache, dass für die Biosynthese und die anschließende Expression eines funktionsfähigen Heterodimers keine Dimerisierung auf Ebene des *Endoplasmatischen Reticulums* zwingend erforderlich ist. In der Konsequenz bedeutet dies, dass es demnach nicht nur konstitutive fakultative Heterodimere gibt, sondern auch solche, die unter Umständen von der Anwesenheit oder Konzentration bspw. eines passenden Liganden abhängig sind.

Die Liganden – Rezeptorinteraktion besitzt dementsprechend speziell bei den fakultativen Heterodimeren eine elementare Bedeutung, so dass diese Schnittstelle im Fokus aktueller Forschungen steht. Mit den Methoden, die in

der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kamen, konnten leider nur wenige neue Erkenntnisse im Bereich der molekularen Grundlagen der Heterodimerisierung gewonnen werden. So bleibt die Frage offen, in welchem stöchiometrischen Verhältnis Liganden an das Dimer binden bzw. ob beide monomeren Untereinheiten an der Bindung des Liganden beteiligt sind. Für das mGluR1 Dimer konnte beispielsweise gezeigt werden, dass jede Untereinheit des GPCR an einen Agonisten bindet, da nur so ein maximaler Effekt auslösbar ist (Kunishima et al., 2000), beim Heterodimer $GABA_{R1/2}$ hingegen ist nur die Extrazellulardomäne der $GABA_{R1}$ - Untereinheit für die Ligandenbindung verantwortlich (Galvez et al., 2001). Interessant erscheint in diesem Zusammenhang auch, dass mittels BRET Technik (Bioluminescence resonance energy transfer) an heterodimerisierten Cholezystokininrezeptoren gezeigt werden konnte, dass die Bindung des Liganden zu einer Reduktion des BRET-Signals führt. Diese Signale können als Änderung in der Konformation des Dimers interpretiert werden (Cheng and Miller, 2001).

Zwei Theorien sollen an dieser Stelle noch angesprochen werden, die im Zusammenhang mit den Effekten der Liganden – Rezeptor – Interaktion in der Literatur bereits beschrieben sind, und deren Überprüfung für den vorliegenden Rezeptor interessante neue Erkenntnisse bringen könnten: Zum einen konnte in Experimenten nachgewiesen werden, dass die Heterodimerisierung von Rezeptoren eine Änderung der Affinität der Dimers zum Liganden im Vergleich zu den monomeren Rezeptoren bedingen kann. So konnte für das $\kappa\text{-}\delta$ Opioidrezeptorheterodimer im Vergleich zu den jeweiligen Homomeren eine deutlich reduzierte Affinität gegenüber selektiven κ - und δ - Liganden nachgewiesen werden (Jordan and Devi, 1999).

Die zweite Theorie bezieht sich auf den sog. kooperativen Effekt, wie er beispielsweise an der Funktionsweise des Transportproteins Hämoglobin gut nachzuvollziehen ist: Hier führt die Bindung eines Sauerstoffmoleküls zu einer Steigerung der Affinität zur Bindung eines zweiten, dritten und vierten Sauerstoffmoleküls. Die Bindung wird also erleichtert, was als positive Kooperativität bezeichnet wird (Ackers et al., 1992). Anders als bei Hämoglobin ist bei Rezeptordimeren oftmals eine negative Kooperativität zu beobachten.

Das heißt die Bindung eines Liganden erschwert die Bindung eines zweiten. Begründet wird dies von R. Franco in seinen Forschungen mit orthosterischen Konformationsänderungen innerhalb des Dimers. Hierzu entwickelte er das Modell des „dimer cooperativity index“, welches eine Quantifizierung des Grades intramolekularer Interaktionen zulässt, die in Folge von Ligandenbindung innerhalb der Rezeptoren ablaufen. Das heißt, neben der Bindungsaffinität der einzelnen Rezeptoren zueinander bzw. zum Liganden, stellt der Kooperativitätsindex einen neuen Parameter dar, um die Rezeptor – Liganden Interaktion zu messen (Casado et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Regulierung der Bildung und Funktion von GPCR Heterodimeren nach jetzigem Wissensstand im wesentlichen über drei Wege möglich ist, deren Existenz und Bedeutung an unterschiedlichen Rezeptoren nachgewiesen werden konnte (vgl. (Rios et al., 2001). Neben der Regulierung mittels der Ligandenbindung, wie dargestellt, spielt zum einen das „trafficking“ eine entscheidende Rolle, worunter der Transport des Heterodimers vom *Endoplasmatischen Reticulum* zur Zellmembran, die Oberflächenexpression und die Endozytose verstanden wird. Zum anderen erfolgt eine Steuerung mittels der Signaltransduktion, also der Interaktion des Rezeptors mit dem entsprechenden G-Protein.

Welche Mechanismen in welchem Ausmaß für das vorliegende Heterodimer [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R von Bedeutung sind, ist bis dato nur teilweise geklärt.

4.1.2 Molekulare Grundlagen der Heterodimerisierung

Nach dem jetzigen Stand der Forschungen sind bereits einige molekularbiologische Mechanismen der Bildung eines Rezeptorheterodimers entschlüsselt, der genaue Aufbau der Schnittstelle zwischen den Rezeptoren ist aber noch in weiten Teilen unbekannt. Aktuell scheint eine Kombination verschiedener Mechanismen wahrscheinlich (Kroeger and Eidne, 2004): Zum einen spielen kovalente Bindungen in Form von Disulfidbrücken eine Rolle, die

sich zwischen den extrazellulären Domänen der Monomere ausbilden (Salim et al., 2002). Eine wichtige Funktion besitzt zudem die Verbindung über die intrazellulär gelegenen C- Termini in Form sog. „coiled- coil“ Domänen (Kammerer et al., 1999). Als dritte Komponente spielen Interaktionen zwischen den Transmembrandomänen die entscheidende Rolle. Hierzu existieren aktuell zwei Theorien: Das Modell der „Contact dimerization“ („lateral packing“) und das „Domain swapping“. Bei der „Contact dimerization“ bildet sich ein Heteromer mithilfe zusätzlicher Interaktionsstellen auf dem extrazellulären Abschnitt der Transmembrandomäne (Kroeger and Eidne, 2004). Dies ermöglicht die Wahrung der Integrität und gegebenenfalls der Funktionalität der einzelnen Rezeptoren, was am Beispiel des Dopamin D2 Rezeptors untersucht worden ist (Lee et al., 2000). Außerdem ist so die Bildung höhergradiger Oligomere möglich.

Beim „Domain swapping“ kommt es hingegen zur Auffaltung zweier Domänen innerhalb der Rezeptormonomere, die sich dann neu zum Heterodimer verbinden, wie bereits 1993 an muskarinen und adrenergen Rezeptoren gezeigt werden konnte (Maggio et al., 1993). Aus dieser Art der Heterodimerisierung, bei der die Integrität der einzelnen Rezeptoren aufgehoben wird und ein Austausch von Domänen stattfindet, ergeben sich weit reichende Konsequenzen für die Quartärstruktur des Rezeptors und damit für seine physiologischen Eigenschaften. Für obig erwähnten muskarinen Rezeptor M3 konnte gezeigt werden, dass es für die Affinität der Ligandenbindung des neu entstandenen Heterodimers essentiell ist, welche Domänen in das „Domain swapping“ involviert sind. Zum Teil konnte so eine um bis zu 20 fache Reduzierung der Bindungsaffinität erzeugt werden (Schoneberg et al., 1995). Am D2 Rezeptor konnte ein anderes Phänomen beobachtet werden: die Dimerisierung führt hier zur Bildung neuer Ligandenbindungsstellen (Zawarynski et al., 1998).

Welche Mechanismen und Strukturen die Heterodimerisierung beim vorliegenden Dimer [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R bewerkstelligen ist bis dato ungeklärt, doch wird von Z. Xie in Experimenten an den beiden Rezeptoren 5-HT_{1A} und 5-HT_{1D} ein weiterer Aspekt in die Diskussion eingebracht: Hier wird postuliert,

dass die Neigung zur Bildung von Heterodimeren umso größer ist, je größer die Homologie der Aminosäuresequenz der Rezeptormonomere ist bzw. je größer die Übereinstimmung ihrer Transmembrandomänen ist. Außerdem erscheinen Überlappungen im anatomischen Expressionsmuster in dieser Theorie ebenso von Bedeutung. Das heißt die Rezeptorheterodimerisierung scheint spezifische zelluläre Mechanismen zu erfordern, denn in Zellmembranen, in denen ausschließlich ein Rezeptorsubtyp des potentiellen Heteromers nachgewiesen werden konnte, führte die Koexpression des jeweiligen zweiten Rezeptors nicht zur Heterodimerisierung. Dahingegen konnte in solchen Geweben, in denen beide Rezeptoren genuin vorkamen, sogar beobachtet werden, dass die Heterodimerisierung bevorzugt vor der homomeren Anordnung existiert. Damit konnte gezeigt werden, dass die Heterodimerisierung kein Ergebnis unspezifischer Aggregation von Rezeptoren ist, sondern spezifische Bedingungen erfordert (Xie et al., 1999).

4.2 Die Heterodimerisierung von 5-HT_{1A} und 5-HT₇

4.2.1 Molekulare Mechanismen der Effekte der Heterodimerisierung

Der Effekt, den eine Heterodimerisierung der Serotoninrezeptoren 5-HT_{1A} und 5-HT₇ auf die Aktivität der GIRK 1/2 Kanäle besitzt, konnte eindeutig nachgewiesen werden: Die Heterodimerisierung bewirkt eine signifikante Reduktion des GIRK- Stroms. Das bedeutet, auf einer bisher nicht identifizierten Ebene der Rezeptor – Kanal Interaktion greift die Heterodimerisierung modulierend in Form der Inhibierung ein.

Daraufhin wurden Experimente durchgeführt, um den Stromfluss in seinen Eigenschaften zu charakterisieren, v. a. in seiner Aktivierungskinetik. Hier konnte gezeigt werden, dass diese bei heteromerer und homomerer Anordnung identisch ist. Dies lässt den Schluss zu, dass die Heterodimerisierung der beiden Rezeptoren keine Veränderung der Stromaktivierung nach sich zieht. Das heißt, die Heteromerisierung führt nicht zu einer Veränderung des

Verhaltens des GIRK- vermittelten Stromflusses. Die Aktivierungskinetik wie auch das Verhalten auf die Applikation des Agonisten sind identisch. Somit konnte der gemessene Strom anhand des Vergleichs der Aktivierungskinetik in beiden Fällen als GIRK- Strom identifiziert werden. Außerdem kann man vermuten, dass die Heterodimerisierung nicht die G- Protein vermittelte Bindung des 5-HT_{1A} Rezeptors an das GIRK 1/2 Kanalprotein inhibiert.

Die Reduzierung des GIRK- Kanalstroms kann demnach wahrscheinlich mit einer Veränderung der Offenwahrscheinlichkeit erklärt werden.

Das Rezeptorheterodimer [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R gehört zur Gruppe der fakultativen Heterodimere (s.o.), deren Dimerisierung im *Endoplasmatischen Reticulum* bekanntermaßen nicht notwendig ist, um die Funktionalität bzw. den Transport des fertigen Proteins in die Zellmembran zu gewährleisten.

Am Beispiel des α_{1D} - Rezeptors konnte jedoch gezeigt werden, dass auch bei fakultativen Heterodimeren eine Kontrolle der Synthesequalität im *Endoplasmatischen Reticulum* erfolgt, so dass gegebenenfalls der Transport zur Zellmembran unterbunden wird (Hague et al., 2004). In diesem Zusammenhang wurde der Begriff des *dominant – negativen* Verhaltens geprägt (Kaykas et al., 2004), der beschreibt, dass beispielsweise zufällige Mutationen in einem der Rezeptorproteine die Heterodimerisierung reduzieren bzw. verhindern. Dies konnte an *Saccharomyces cerevisiae*, Hefe, demonstriert werden, wo ein durch Mutationen veränderter *α -mating factor* die Dimerisierung und damit die Oberflächenexpression α des α -factor Rezeptoroligomers signifikant reduziert (Overton et al., 2003).

Übertragen auf [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R lautet die Fragestellung: Führt die Expression des 5-HT₇ Rezeptors über einen ähnlichen zugrunde liegenden Mechanismus zur Inhibierung des Membrantransports des [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R und damit zu einer reduzierten Anzahl funktionsfähiger Rezeptorheterodimere in der Zellmembran? Die Folge wäre eine reduzierte Menge 5-HT_{1A} Rezeptors in der Membran und damit eine verminderte Anzahl aktivierter G- Proteine, was letztlich zur Reduktion des gemessenen GIRK Stroms führen würde.

4.2.2 Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen

Eine Überprüfung dieser Theorie erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand der Messung fluoreszenzmarkierter GIRK 1/2 Proteine. Wie im Ergebnisteil dargestellt wurde, wurden die *Xenopus laevis* Oozyten, in denen die cRNA eines Fluoreszenz markierten GIRK 1/2 Kanals zusammen mit der cRNA der beiden Rezeptoren exprimiert wurde, unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Hier konnte anhand des Vergleichs der Leuchtintensität gezeigt werden, dass kein messbarer Unterschied in der Expression der GIRK 1/2 Proteine zwischen den Oozyten vorliegt, in denen das Rezeptorheterodimer exprimiert war, und denen, in denen ausschließlich der 5-HT_{1A} Rezeptor exprimiert wurde. Hieraus lassen sich mehrere wichtige Schlüsse ziehen:

Die Leuchtintensität ist das Maß für die Anzahl der GIRK 1/2 Kanäle, die exprimiert wurden. Somit lässt sich hieraus indirekt die Expression von 5-HT_{1A} bzw. des Heterodimers [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R beurteilen. Nachdem hier kein Unterschied zwischen den Oozyten zu erkennen war, in denen ausschließlich [5-HT_{1A} – GIRK 1/2]-SK exprimiert wurde, bedeutet dies, dass die Heterodimerisierung nicht zu einer Reduktion der Expressionsrate des GIRK 1/2 Kanals führt.

Mithilfe des Vergleichs der Leuchtintensitäten kann eine weitere Hypothese widerlegt werden. Wie beispielsweise an Untersuchungen des TASK-5 gezeigt werden konnte (Karschin et al., 2001), kann die Heterodimerisierung auch auf der Ebene der Biosynthese eingreifen, im Fall der vorliegenden Arbeit in die des GIRK 1/2 Kanalproteins, so dass die Heterodimerisierung eine Reduktion der Syntheserate der Ionenkanäle bewirkt, was eine plausible Erklärung für den reduzierten GIRK- Strom darstellen könnte. Auch diese Möglichkeit scheidet jedoch anhand des Fluoreszenzvergleichs aus.

Es kann zudem eine Aussage dahingehend getroffen werden, dass auf molekularer Ebene der präformierte Komplex mit den Komponenten G- Protein, GIRK 1/2 Kanalprotein und 5-HT_{1A} Rezeptor durch die Heterodimerisierung mit 5-HT₇ nicht inhibiert wird, denn auch dies würde eine Minderung der Leuchtintensität bedeuten. Da mittels Fluoreszenz jedoch ausschließlich die

Expressionsrate des GIRK 1/2 Kanalproteins in der Zellmembran gemessen wird, nicht aber die Funktionalität bzw. Kopplung an 5-HT_{1A}, wurden weitere elektrophysiologische Experimente durchgeführt: Mit Hilfe von *Voltage Clamp* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R, exprimiert zusammen mit fluoreszenzmarkierten GIRK 1/2 Kanalprotein, über die gleichen elektrophysiologischen Eigenschaften verfügt, wie in den Versuchen, als nicht Fluoreszenz markierte GIRK 1/2 Kanäle exprimiert wurden.

Dennoch muss hier angemerkt werden, dass mittels Fluoreszenzmessung nur indirekt eine Charakterisierung der Interaktion zwischen G- Protein, GIRK 1/2 und 5-HT_{1A} Rezeptor möglich ist. Hier sind weitere Experimente auf molekularbiologischer Ebene nötig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht gemacht wurden. Zudem sind hier ergänzende Methoden zu den Fluoreszenzmessungen sinnvoll, wie etwa eine Untersuchung mittels FRET-Technik (Fluorescence Resonance Energy Transfer).

Eine weitere Erkenntnis, welche mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie gewonnen werden konnte, betrifft die Mechanismen der Heterodimerisierung von GPCRs: wie bereits dargestellt wurde, sind diese vielfältig und für das vorliegende Heterodimer [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R noch nicht im Detail klar. Unabhängig davon stellt sich aber primär die Frage, ob die Heterodimerisierung die Folge einer Ligandeninteraktion darstellt, demnach ligandenvermittelt ist, oder ob sie konstitutiv ist, also stabil und existent ohne äußere Einflüsse (Angers et al., 2002). Eine dritte Möglichkeit besteht darin, dass die Heterodimere zwar konstitutiv entstehen, aber dennoch durch den Einfluss von Liganden im Ausmaß ihrer Bildung sowie in ihren Eigenschaften moduliert werden.

Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die erste Möglichkeit einer rein ligandenabhängigen Heterodimerisierung nicht in Betracht kommt. Denn auch die Oozyten, die zuvor keinen Kontakt mit dem Liganden Serotonin hatten, besaßen die gleiche Intensität an Fluoreszenz wie jene Oozyten, die zuvor mit Serotonin in Kontakt gekommen waren. Anschließend konnte bei beiden Gruppen eine identische Reduzierung des

GIRK 1/2 Stromflusses bei Inhibierung mittels Serotonin elektrophysiologisch gemessen werden.

Somit bleibt die Frage, welchen Effekt die Bindung von Liganden an das Heterodimer hat und welche molekularen Veränderungen sich in dem Rezeptorheterodimer durch den Prozess der Heterodimerisierung ergeben, wahrscheinlich ist eine verminderte Aktivierung der $\beta\gamma$ - Untereinheit des Rezeptors und somit eine reduzierte Offenwahrscheinlichkeit des Ionenkanals GIRK 1/2. Möglich wäre auch eine Reduktion der Einzelkanalleitfähigkeit. Eine Aussage bezüglich der Expressionsrate des Rezeptordimers mit den durchgeführten Fluoreszenzmessungen jedoch nicht möglich.

4.2.3 Physiologische Charakterisierung des Heterodimers

Nachdem im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Heterodimerisierung der Rezeptoren 5-HT_{1A} und 5-HT₇ eine signifikante Reduktion des GIRK Stroms bewirkt, wurden weitere Experimente unternommen, um die Spezifität dieser Wirkung zu überprüfen. So konnte auch der Einfluss von Homologien in der Aminosäuresequenz sowie der Einfluss von Verwandtschaftsgraden zwischen verschiedenen Vergleichsrezeptoren beurteilt werden.

Diese Experimente haben gezeigt, dass die stromreduzierende Wirkung auf GIRK 1/2 beim Rezeptorheterodimer [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R signifikant größer ist als bei der Koexpression aller weiteren Vergleichsrezeptoren. Hierbei wurde ein breites Spektrum an Rezeptoren untersucht: Mit dem 5-HT_{2C} Rezeptor wurde ein nah verwandter Rezeptor aus der Familie der Serotoninrezeptoren ausgewählt. Dabei zeigt der Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen dem 5-HT_{2C}- und dem 5-HT_{1A} Rezeptor eine Homologie von 45 %, wohingegen der 5-HT₇ Rezeptor eine Homologie von 49 % mit dem 5-HT_{1A} aufweist (Hoyer et al., 2002). Als weitere Rezeptoren wurden der Histaminrezeptor H1 sowie der Bradykininrezeptor B1 verwendet. Auch bei der Koexpression dieser Rezeptoren zusammen mit 5-HT_{1A} konnte kein Strom reduzierender Effekt

nachgewiesen werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die Effekte, die bei dem Heterodimer [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R beobachtet werden können, spezifischer Natur sind.

Inwieweit Homologien und Expressionsmuster hier als Erklärung dienen können, ist schwer zu beurteilen. Speziell der prozentuale Unterschied zwischen 5-HT₇ und 5-HT_{2C} im Vergleich zu 5-HT_{1A} erscheint mit 4 % gering, dennoch sei angemerkt, dass dies nicht als Gegenbeweis gesehen werden kann. Immerhin sind es oft nur einzelne Aminosäuren, die darüber entscheiden, ob eine intermolekulare Bindung und damit ein funktionsfähiges Protein zustande kommt oder nicht, wie am Beispiel der Sichelzellanämie eindrucksvoll belegt ist: Hier kommt es zum Austausch eines Glutamatrestes in der β - Kette des Hämoglobins, mit der Folge, dass die Funktionalität des Hämoglobins massiv beeinträchtigt ist.

Zur Regulation der Liganden – Rezeptor Interaktion wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch drei weitere Versuche gemacht. Es konnte gezeigt werden, dass die Reduzierung des GIRK 1/2 Stroms von der Menge des exprimierten 5-HT₇ Rezeptors abhängig ist. Dementsprechend wurde der Effekt abgeschwächt, als Verdünnungen der Rezeptor cRNA heterolog exprimiert wurden (5:1 bzw. 10:1, H₂O zu Rezeptor cRNA). Dieser Effekt war signifikant, wenngleich sich keine direkte Proportionalität nachweisen ließ. Hier müsste anhand weiterer molekularbiologischer Verfahren untersucht werden, welchen Effekt die Reduzierung der exprimierten cRNA Dosis auf die Heterodimerisierung [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R besitzt.

In einem weiteren Versuch wurde geprüft, ob die Effekte des 5-HT₇ Rezeptors im Rahmen der Heterodimerisierung blockiert werden können. Hierzu wurde der Rezeptorinhibitor Clozapin verwendet, wobei anzumerken ist, dass es sich hierbei nicht um einen selektiven 5-HT₇ Rezeptorinhibitor handelt. Derartige Substanzen sind derzeit nicht bekannt. Die Oozyten wurden vor den *Voltage Clamp*- Messungen für fünf Minuten in einer Clozapinlösung inkubiert und anschließend elektrophysiologisch gemessen. Diese Experimente ergaben keine Veränderungen der physiologischen Eigenschaften. Dieser Versuch legt

die Vermutung nahe, dass die Effekte, die aus der Heterodimerisierung hervorgehen und in den elektrophysiologischen Messungen zu beobachten waren, struktureller Art sind. Das heißt die inhibierende Substanz Clozapin, welche hemmend auf den 5-HT₇ Rezeptor wirkt, kann die Effekte der Heterodimerisierung nicht rückgängig machen.

Schließlich wurde geprüft, ob das mehrmalige Applizieren gleicher Agonisten-Konzentrationen zu einem Desensitisierungseffekt führt. Dies konnte nicht nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die *in vitro* gemessene Desensitisierung der 5-HT Antwort nicht durch ein [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R Dimer vermittelt ist.

4.2.4 Beeinflussung der TASK-1 Inhibition durch heterodimere Rezeptoren

Ein weiterer Kernpunkt der Arbeit bestand in der Untersuchung der Interaktion der beiden Rezeptoren. Zum einen sollte geprüft werden, ob die Heterodimerisierung von 5-HT_{1A} und 5-HT₇ auch dann zu den gleichen Ergebnissen einer reduzierten Stromamplitude führt, wenn statt eines GIRK- ein TASK- Kanal verwendet wird. Das heißt, das Expressionssystem wurde dahingehend verändert, dass nun 5-HT_{1A} ergänzend zu [5-HT₇ – TASK-1]-SK koexprimiert wurde.

Die Experimente mit TASK zeigen eine Reduktion des agonistenabhängigen Stromflusses, wie sie auch bei den Versuchen mit GIRK beobachtet werden konnte. Das untermauert zum einen die Erkenntnis, dass die Heterodimerisierung von 5-HT_{1A} und 5-HT₇ einen signifikanten physiologischen Effekt besitzt. Zum anderen ergibt sich hieraus wiederum die Frage nach den molekularen Mechanismen, welche diesen Effekten zugrunde liegen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es durch die Heterodimerisierung zu strukturellen Veränderungen der Bindung der Rezeptoren an ihre Effektorproteine (hier: GIRK 1/2 bzw. TASK-1) kommt oder zumindest die Signaltransduktion beeinflusst wird.

Dennoch haben sich mehrere kritische Fragen bei der statistischen Auswertung dieses Versuches ergeben: Zum einen liegt der Standardfehler bei den Messungen der Inhibition bei den Oozyten ohne 5-HT_{1A} bei 2,66 % (100 nM) bzw. 2,49 % (500 nM) bei n = 24, was letztlich die teilweise großen Varianzen der einzelnen Messungen widerspiegelt, wobei ursächlich möglicherweise qualitative Faktoren der präparierten Oozyten eine Rolle spielen.

Ein weiterer kritischer Punkt liegt im Nachweis der Signifikanz. Die Auswertung der Daten hat ergeben, dass diese nur dann zu belegen ist, wenn für den quantitativen Vergleich auch jene Oozyten mit der Kontrolle [5-HT₇ – TASK-1]-SK herangezogen werden, die nicht aus den Präparationen stammen, aus denen jene Oozyten stammen, die mit TASK-1, 5-HT₇ und 5-HT_{1A} injiziert wurden. So wurden zur Auswertung n = 24 Oozyten mit der Kontrollinjektion ([5-HT₇ – TASK-1]-SK) verwendet aus acht verschiedenen Oozyten Chargen, während nur n = 15 Oozyten aus drei unterschiedlichen Chargen der Injektion TASK-1, [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R untersucht wurden.

Als letzter Punkt bleibt anzumerken, dass in 13 von 14 Oozyten, in denen [5-HT_{1A}+5-HT₇]-R exprimiert wurde, die maximale Rezeptorinhibition bei unter 10 % des TASK-1- Basalstroms lag, so dass der Einfluss von Störfaktoren, wie von Leckströmen oder zusätzlichen endogenen Oozytenströmen, nicht mit Sicherheit identifiziert werden konnte und diese möglicherweise in die Auswertung der Ergebnisse eingeflossen sind.

4.3 Biologische bzw. medizinische Bedeutung der Serotoninrezeptoren

Serotonin und Serotoninrezeptoren kommen im Säugerorganismus in vielen Geweben und Organen vor, woraus sich eine Vielzahl unterschiedlicher Effekte ergibt, die durch Serotonin vermittelt sind. Wie bereits in der Einleitung der vorliegenden Arbeit dargestellt wurde, gliedern sich die Serotoninrezeptoren in sieben Hauptgruppen mit zahlreichen Untergruppen, so dass sich hieraus eine

große Zahl verschiedener Rezeptoren ergibt. Mit Ausnahme des 5-HT₃ Rezeptors gehören sie alle zu den G- Protein gekoppelten 7- Helix- Rezeptoren GPCR. Sinnvollerweise lassen sich periphere und zentrale Wirkungen des Serotonins unterscheiden.

4.3.1 5-HT Rezeptoren in der Peripherie – physiologische Effekte

Die wichtigsten peripheren Expressionszentren stellen das kardiovaskuläre System und der Magen-/Darmtrakt dar. Die Wirkungen auf das Herz-/Kreislaufsystem sind äußerst komplex: Während Serotonin in Lunge und Niere als Vasokonstriktor wirkt, ist die Wirkung in der Skelettmuskulatur Gefäß dilatierend. Vermittelt werden diese Wirkungen in erster Linie durch 5-HT₂, 5-HT₃ und 5-HT₇ Rezeptoren, jedoch sind wahrscheinlich noch weitere Serotoninrezeptoren involviert.

Die physiologischen Effekte auf den Magen-/Darmtrakt betreffen Enterozyten, die glatte Muskulatur, das intrinsische Nervensystem (Teil des PNS) sowie extrinsische Afferenzen. Die Effekte sind äußerst vielfältig und werden primär durch die Serotoninrezeptoren 5-HT₃, 5-HT₄ und 5-HT₇ vermittelt. Nachdem im Fokus der Arbeit die Expression Serotoninrezeptoren im ZNS steht, soll an dieser Stelle nicht näher auf die peripheren Funktionen eingegangen werden.

4.3.2 5-HT Rezeptoren im ZNS – physiologische Effekte

Serotoninrezeptoren spielen eine wichtige Rolle in zahlreichen Vorgängen innerhalb des ZNS, wie bereits in der Einleitung dargestellt wurde. Entsprechend differenziert gestaltet sich das Expressionsmuster der einzelnen 5-HT Rezeptoren, insbesondere der beiden hier untersuchten 5-HT_{1A} und 5-HT₇, das mithilfe zahlreicher Untersuchungen entschlüsselt werden konnte (s. u.). Zwar konnte anhand dieser Expressionskarten gezeigt werden, dass zahlreiche Überlappungen in der Expression der einzelnen 5-HT Rezeptoren existieren; der Beweis, dass es zwischen den Rezeptoren auch zur

Heterodimerisierung kommt, konnte aber erst kürzlich erbracht werden (Kobe et al., 2008).

4.4 Pathophysiologische Bedeutung der Heterodimerisierung

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit können Rückschlüsse auf die tatsächliche Relevanz der Heterodimerisierung des 5-HT_{1A}- und 5-HT₇ Rezeptors gezogen werden.

Voraussetzung hierfür sind jedoch folgende Bedingungen: Zum einen muss die Frage gestellt werden, ob *in vivo* beide Rezeptoren in denselben Zellen exprimiert sind, oder ob allein die Versuchsanordnung die Koexpression der beiden Rezeptoren in einer Zelle, einer *Xenopus laevis* Oozyte, ermöglicht.

Dass es sich hierbei nicht um einzelne, spontan aufgetretene Heterodimere handelt, konnte mithilfe von immunhistochemischen Verfahren bewiesen werden (Kobe et al., 2008), was eine tatsächliche physiologische Funktion *in vivo* nahe legt.

Die zweite Frage gestaltet sich ungleich schwieriger: Liegt das Expressionsniveau der Rezeptoren, welches im modellhaften Versuch an *Xenopus laevis* Oozyten erreicht wurde, in einer Größenordnung, die physiologischen Werten entspricht?

Die Antwort hierauf ist schwierig, zumal anhand einer 2002 verfassten Studie gezeigt werden konnte, dass bspw. ein δ - opioid Rezeptor ein Heterodimer mit einem β_2 - Adrenorezeptor bilden kann, sofern diese sehr hoch exprimiert sind (Ramsay et al., 2002). Bezogen auf die vorliegenden Rezeptoren 5-HT_{1A} und 5-HT₇ lässt sich die Aussage machen, dass ohne Zweifel eine Dosisabhängigkeit in den elektrophysiologischen Effekten der Heterodimerisierung beobachtet werden kann, wie bereits dargestellt wurde. Hier war gut zu beobachten, dass die Koexpression einer zu großen Menge an 5-HT₇- cRNA zum Untergang der meisten Oozyten bereits während der Inkubationszeit führte. Auf der anderen Seite führte die Reduktion der Dosis sukzessive zu einer Minderung der

Stromamplitude, so dass bereits auf diese Weise Grenzen der 5-HT₇-Konzentration in den Oozyten ermittelt werden konnten. Unter Verwendung von Konzentrationen, welche von den Oozyten während der Inkubation gut toleriert wurden, konnten Wirkungsgrenzen in Form von Dosis-/Wirkungskurven ermittelt werden.

4.4.1 Expressionsmuster der 5-HT Rezeptoren 5-HT_{1A} und 5-HT₇ im ZNS

Um die physiologische Bedeutung der Heterodimerisierung einschätzen zu können, sollte zunächst die Expressionsmuster im ZNS im Hinblick auf eine überlappende Verteilung geprüft werden. Anschließend soll die physiologische Funktion der einzelnen Rezeptoren betrachtet werden.

Beide Rezeptoren weisen eine hohe Expressionsrate im Bereich des limbischen Systems auf, das heißt im Bereich des *Hippocampus*, des lateralen und *medialen Septums* sowie der *Amygdala*. Außerdem konnten beide Rezeptoren im Bereich des *Hypothalamus*, vornehmlich in den *anterioren Nuclei*, im Bereich des *Colliculus superior* sowie in den superfiziellen Bereichen des *Cortex*, hier jedoch in geringerer Dichte, nachgewiesen werden (Chalmers and Watson, 1991) (Gustafson et al., 1996).

Im Gegensatz dazu konnte in folgenden Regionen des ZNS ein evidenter Unterschied in der Expressionsrate der Rezeptoren bewiesen werden: Der 5-HT_{1A} Rezeptor findet sich hoch exprimiert vor in de dorsalen *Raphé- Nuclei*, tief im frontalen *Cortex* sowie in den *Pyramidenbahnzellen*. Nicht bzw. in geringer Dichte nachzuweisen gelang der 5-HT_{1A} Rezeptor dagegen in *Thalamus*, den *Basalganglien* und nahezu im gesamten *Cerebellum*, dem *Pons* und der *Medulla oblongata* – hier lässt sich stattdessen eine moderate bis hohe 5-HT₇ Rezeptordichte nachweisen (Chalmers and Watson, 1991) (Gustafson et al., 1996).

Das *limbische System* mit seinen Strukturen steht mittels zahlreicher Afferenzen und Efferenzen in enger kommunikativer Verbindung zum Großhirn

und den *Basalganglien* und fungiert als Steuerungselement emotionaler und unwillkürlicher Prozesse, des Verhaltens sowie des deklarativen Gedächtnisses. Es ist die Zentralstelle des endokrinen, vegetativen und psychischen Regulationssystems.

Der *Hypothalamus* liegt im *Diencephalon*, dem Zwischenhirn, und fungiert als wichtigstes Steuerzentrum vegetativer Körperfunktionen. Hierunter fallen die Regulation der Homöostase von Blutdruck, Temperatur und Osmolarität, die Generierung der circadianen Rhythmik, Steuerung des Nahrungsverhaltens sowie der Fortpflanzungstrieb.

Wie bereits elektrophysiologisch gezeigt werden konnte, verursacht die 5-HT_{1A} Aktivierung eine neuronale Hyperpolarisation, vermittelt durch Kir- Kanäle (vgl. (Aghajanian et al., 1990)). Bezogen auf den *Hippocampus* bedeutet das eine Inhibierung der neuronalen Aktivität (Ashby et al., 1994), wobei sich prä- und postsynaptische 5-HT_{1A} Rezeptoren in ihren Regulations- und pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden (vgl. (Clarke et al., 1996)). Bezogen auf andere ZNS- Regionen, insbesondere die dorsalen *Raphé- Nuclei*, bedeutet die Aktivierung von 5-HT_{1A} Rezeptoren mittels 5-HT oder Analoga eine Reduzierung der Entladungsfrequenz der Neuronen – die Aktivität der Neuronen wird inhibiert (Sprouse and Aghajanian, 1988).

Die Aktivierung des 5-HT₇ Rezeptors im *Nucleus suprachiasmaticus* des *Hypothalamus* hat wahrscheinlich Einfluss auf den circadianen Rhythmus von Säugetieren (Edgar et al., 1993), wobei hier auch eine Beteiligung des 5-HT_{1A} Rezeptors postuliert wird (Prosser et al., 1993). In *hippocampalen Pyramidenneuronen* konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des 5-HT₇ Rezeptors zu einer Inhibition der langsamen Nachhyperpolarisation führt.

Diese Darstellung verdeutlicht, wie eng die Funktions- und Wirkweise des 5-HT_{1A} Rezeptors mit jener des 5-HT₇ Rezeptors verknüpft ist. Die Darstellung zeigt auch, wie sensibel vegetative und psychokognitive Vorgänge innerhalb des ZNS mithilfe des Serotonins bzw. den Serotoninrezeptoren reguliert sind, so dass die Bedeutung einer Heterodimerisierung Serotoninrezeptoren hieraus zu erkennen ist: Für den Organismus ergeben sich völlig neue Möglichkeiten

regulativ und modulierend die neuronalen Vorgänge an serotonergen Zellen zu beeinflussen.

4.4.2 Medizinische Relevanz der Heteromerisierung von GPCRs

Von einem medizinischen Standpunkt aus betrachtet, drängen sich weiterführende Fragen auf: Wie verhält es sich mit möglichen neuen Ansätzen in der Pharmakotherapie und im Zusammenhang damit die Frage, in welchen pathologischen Prozessen spielt der 5-HT_{1A}- und 5-HT₇ Rezeptor bzw. dessen Heterodimerisierung eine Rolle.

Erstere Frage ist schwer zu beantworten, da die pharmakologische Forschung im Bereich der Heterodimerisierung von GPCRs noch am Anfang steht. Dennoch konnte erstmals 1999 an Studien zu den δ - und κ - Opioid Rezeptoren demonstriert werden, dass die Heterodimerisierung zu einem signifikant veränderten Verhalten gegenüber den selektiven Agonisten der Homo- bzw. Monomere führt (Jordan and Devi, 1999). Kritisch anzumerken bleibt jedoch, dass die beobachteten Effekte auch auf eine veränderte Kooperativität zurückzuführen sein könnten. Damit ist es zum gegenwärtigen Zeitpunkt zwar nicht möglich, die Breite der Möglichkeiten für neue pharmakologische Ansätze abzuschätzen, es existieren jedoch erste konkrete Anwendungsmöglichkeiten, wie an folgendem Beispiel belegt ist: An isolierten Mauszellen führte die selektive Blockade des AT I Rezeptors bzw. des β 2 Rezeptors jeweils zur Inhibition beider Rezeptoren (Reggio, 2006), was auf die Möglichkeit der Heterodimerisierung der beiden Rezeptoren zurückzuführen ist.

Wenn man jedoch die Anzahl neuerlicher Studien betrachtet, in denen eine Änderung der pharmakologischen Eigenschaften von GPCR- Heterodimeren beschrieben wird, so scheint es immer wahrscheinlicher, dass die Heterodimerisierung *in vivo* einen elementaren Einfluss auf die Steuerung der Rezeptoren, insbesondere auf ihre pharmakologischen Eigenschaften besitzen kann (Prinster et al., 2005).

Ein weiterer Ansatz ist die Suche nach immer selektiveren Pharmaka, die spezielle Zielstrukturen des Heterodimers zum Ziel haben (George et al., 2002), jedoch bieten die bisherigen Methoden nicht die erhofften Lösungen, so dass hier bis dato keine relevanten Ergebnisse vorliegen.

Der Zusammenhang des Serotoninstoffwechsels mit pathologischen Prozessen ist unbestritten, wobei das Spektrum von Erkrankungen des depressiven- und schizoiden Formenkreises bis hin zu Morbus Alzheimer sowie zu Angst und Angstzuständen reicht (vgl. (Graeff et al., 1996)). Zugrunde liegen vielfältige Störungen auf Ebene der Serotoninrezeptoren oder auf Ebene des Serotonins. In der Bedeutung dieser Erkrankungen für den einzelnen Patienten liegt jedoch die Motivation begründet, die Zusammenhänge und damit auch die Therapiemöglichkeiten weiter zu erforschen, um sie im Einzelnen zu verstehen. Zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte hierbei die zentrale Bedeutung des 5-HT_{1A}- Rezeptors (Yates and Ferrier, 1990). In neueren Forschungen scheint auch die Bedeutung des 5-HT₇- Rezeptors v. a. im Hinblick auf die Pathogenese der Depression zunehmend etabliert zu sein (Nandam et al., 2007): Es konnte bspw. gezeigt werden, dass der 5-HT₇ Rezeptor direkt in die Modulation des REM Schlafs involviert ist, so dass ein Zusammenhang mit den im Rahmen von Depressionen häufig auftretenden Schlafstörungen besteht, was ein erster pharmakologischer Ansatzpunkt in der Therapie darstellt (Le Bon et al., 1997). An 5-HT₇ Knockout- Mäusen konnte zudem in Verhaltensversuchen beobachtet werden, dass diese ein ähnliches „antidepressant like“ – Verhalten zeigen, wie solche Mäuse, die pharmakologisch mit 5-HT₇ Antagonisten behandelt wurden (Guscott et al., 2005).

Bezogen auf das Thema der vorliegenden Arbeit stellt sich also die Frage, welche Rolle die Heterodimerisierung speziell dieser beiden Rezeptoren im Bezug auf neuropathologische Vorgänge hat, nachdem im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass die Heterodimerisierung von 5-HT_{1A} und 5-HT₇ nicht nur physiologischerweise *in vivo* existiert, sondern auch signifikante Effekte zeigt.

5 Zusammenfassung

Die Heterodimerisierung von G- Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) stellt ein aktuelles Forschungsgebiet dar, das molekulare Erklärungsmöglichkeiten für die Vielfalt der Signalwege über solche Rezeptoren aufzeigt. Die genauen Funktionen diese Konstrukte *in vivo* sind bisher erst in Ansätzen erforscht, ebenso wenig sind die molekularbiologischen Mechanismen, welche die Heterodimerisierung bewirken und deren Effekte vermitteln, vollends erforscht und verstanden.

Für die beiden Serotoninrezeptoren 5-HT_{1A} und 5-HT₇ gelang kürzlich der Nachweis solcher Heterodimere (Ponimaskin, unveröffentlicht), so dass es das Ziel dieser Arbeit war, die physiologischen Mechanismen und Effekte dieser Heterodimerisierung näher zu erforschen. Hierzu wurden primär elektrophysiologische Messverfahren verwendet und Ströme an dem heterologen Expressionsmodell der Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* mittels Voltage-Clamp Technik an Kaliumionenkanälen (Kir3 und TASK-1) gemessen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die heterodimere Koexpression beider Rezeptoren eine signifikante Reduktion des Rezeptor-aktivierten Kanalstroms im Vergleich zur homomeren Expression zur Folge hatte. Weitere Experimente konnten dann zeigen, dass diese Effekte spezifisch für dieses Rezeptorheterodimer sind, und dass die Effekte von der Dosis bzw. dem Verhältnis der exprimierten cRNA abhängen. In Fluoreszenzmessung konnte zudem gezeigt werden, dass die Reduktion der Stromamplitude in der heterodimeren Expression nicht auf eine Reduktion von Kanalproteinen in der Zellmembran zurückzuführen ist. Zur weiteren Charakterisierung des bisher erst in Ansätzen erforschten 5-HT₇ Rezeptors wurde dieser abschließend mit einem β -adrenergen Rezeptor verglichen, der über den gleichen Signalweg bzw. Ionenkanal funktioniert. Auch hier zeigte sich eine signifikante Reduktion des Kanalstroms beim 5-HT₇ Rezeptor.

Die physiologische Relevanz dieser Ergebnisse liegt darin begründet, dass ein weiterführendes Verständnis von 5-HT Rezeptor vermittelten Signalwegen,

insbesondere von der Bedeutung und den Mechanismen ihrer Heterodimersierung, neue pathophysiologische Zusammenhänge verdeutlicht. Speziell im Hinblick auf Erkrankungen, die mit den 5-HT Rezeptoren assoziiert sind, wie etwa Depressionen und Angststörungen, soll sich hieraus die Möglichkeit spezifischerer Therapien ergeben.

Literaturverzeichnis

Abdalla, S., Lother, H., el Massiery, A., and Quitterer, U. (2001). Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med* 7, 1003-1009.

Ackers, G.K., Doyle, M.L., Myers, D., and Daugherty, M.A. (1992). Molecular code for cooperativity in hemoglobin. *Science* 255, 54-63.

Aghajanian, G.K., Sprouse, J.S., Sheldon, P., and Rasmussen, K. (1990). Electrophysiology of the central serotonin system: receptor subtypes and transducer mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 600, 93-103; discussion 103.

Agnati, L.F., Ferre, S., Lluís, C., Franco, R., and Fuxe, K. (2003). Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol Rev* 55, 509-550.

Albert, P.R., Sajedi, N., Lemonde, S., and Ghahremani, M.H. (1999). Constitutive G(i2)-dependent activation of adenylyl cyclase type II by the 5-HT1A receptor. Inhibition by anxiolytic partial agonists. *J Biol Chem* 274, 35469-35474.

Angers, S., Salahpour, A., and Bouvier, M. (2002). Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 409-435.

Ashby, C.R., Jr., Edwards, E., and Wang, R.Y. (1994). Electrophysiological evidence for a functional interaction between 5-HT1A and 5-HT2A receptors in the rat medial prefrontal cortex: an iontophoretic study. *Synapse* 17, 173-181.

Bai, M. (2004). Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction. *Cell Signal* 16, 175-186.

Baker, L.P., Nielsen, M.D., Impey, S., Metcalf, M.A., Poser, S.W., Chan, G., Obrietan, K., Hamblin, M.W., and Storm, D.R. (1998). Stimulation of type 1 and type 8 Ca²⁺/calmodulin-sensitive adenylyl cyclases by the G_s-coupled 5-hydroxytryptamine subtype 5-HT7A receptor. *J Biol Chem* 273, 17469-17476.

Ballesteros, J.A., and Weinstein, H. (1994). Integrated methods for the construction of three dimensional models and computational probing of structure-function relations in G-Protein coupled receptors. *Methods Neurosci* 25, 366-428.

Baneres, J.L., and Parello, J. (2003). Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. *J Mol Biol* 329, 815-829.

Bard, J.A., Zgombick, J., Adham, N., Vaysse, P., Branchek, T.A., and Weinshank, R.L. (1993). Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT7) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol Chem* 268, 23422-23426.

Bartter, F.C., Pronove, P., Gill, J.R., Jr., and Maccardle, R.C. (1962). Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome. *Am J Med* 33, 811-828.

Berman, D.M., Wilkie, T.M., and Gilman, A.G. (1996). GAIP and RGS4 are GTPase-activating proteins for the Gi subfamily of G protein alpha subunits. *Cell* 86, 445-452.

Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2, 274-286.

Breit, A., Lagace, M., and Bouvier, M. (2004). Hetero-oligomerization between beta2- and beta3-adrenergic receptors generates a beta-adrenergic signaling unit with distinct functional properties. *J Biol Chem* 279, 28756-28765.

Brown, N.A., McAllister, G., Weinberg, D., Milligan, G., and Seabrook, G.R. (1995). Involvement of G-protein alpha il subunits in activation of G-protein gated inward rectifying K⁺ channels (GIRK1) by human NPY1 receptors. *Br J Pharmacol* 116, 2346-2348.

Buckingham, S.D., Kidd, J.F., Law, R.J., Franks, C.J., and Sattelle, D.B. (2005). Structure and function of two-pore-domain K⁺ channels: contributions from genetic model organisms. *Trends Pharmacol Sci* 26, 361-367.

Bulenger, S., Marullo, S., and Bouvier, M. (2005). Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci* 26, 131-137.

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

Casado, V., Cortes, A., Ciruela, F., Mallol, J., Ferre, S., Lluís, C., Canela, E.I., and Franco, R. (2007). Old and new ways to calculate the affinity of agonists and antagonists interacting with G-protein-coupled monomeric and dimeric receptors: the receptor-dimer cooperativity index. *Pharmacol Ther* 116, 343-354.

Chalmers, D.T., and Watson, S.J. (1991). Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain--a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. *Brain Res* 561, 51-60.

Chapin, E.M., and Andrade, R. (2000). Calcium-independent afterdepolarization regulated by serotonin in anterior thalamus. *J Neurophysiol* 83, 3173-3176.

Chapin, E.M., and Andrade, R. (2001a). A 5-HT(7) receptor-mediated depolarization in the anterodorsal thalamus. I. Pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 297, 395-402.

Chapin, E.M., and Andrade, R. (2001b). A 5-HT(7) receptor-mediated depolarization in the anterodorsal thalamus. II. Involvement of the hyperpolarization-activated current I(h). *J Pharmacol Exp Ther* 297, 403-409.

Chen, X., Talley, E.M., Patel, N., Gomis, A., McIntire, W.E., Dong, B., Viana, F., Garrison, J.C., and Bayliss, D.A. (2006). Inhibition of a background potassium channel by Gq protein alpha-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3422-3427.

Cheng, Z.J., and Miller, L.J. (2001). Agonist-dependent dissociation of oligomeric complexes of G protein-coupled cholecystinin receptors demonstrated in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 276, 48040-48047.

Clapham, D.E. (1994). Direct G protein activation of ion channels? *Annu Rev Neurosci* 17, 441-464.

Clapham, D.E. (1997). The molecular control of cardiac ion channels. *Heart Vessels Suppl* 12, 168-169.

Clarke, W.P., Yocca, F.D., and Maayani, S. (1996). Lack of 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated inhibition of adenylyl cyclase in dorsal raphe of male and female rats. *J Pharmacol Exp Ther* 277, 1259-1266.

Czirjak, G., and Enyedi, P. (2002). TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol Endocrinol* 16, 621-629.

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

Dascal, N., Lim, N.F., Schreibmayer, W., Wang, W., Davidson, N., and Lester, H.A. (1993a). Expression of an atrial G-protein-activated potassium channel in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6596-6600.

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

Douppnik, C.A., Davidson, N., and Lester, H.A. (1995). The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol* 5, 268-277.

Douppnik, C.A., Davidson, N., Lester, H.A., and Kofuji, P. (1997). RGS proteins reconstitute the rapid gating kinetics of Gbetagamma-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10461-10466.

Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77.

Dumont, J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136, 153-179.

Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997). TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J* 16, 5464-5471.

Edgar, D.M., Miller, J.D., Prosser, R.A., Dean, R.R., and Dement, W.C. (1993). Serotonin and the mammalian circadian system: II. Phase-shifting rat behavioral rhythms with serotonergic agonists. *J Biol Rhythms* 8, 17-31.

Eglen, R.M., Alvarez, R., Carter, D., Leung, E., Jakeman, L., To, Z., and Tsou, A.P. (1997). Cloned and native guinea pig 5-HT₇ receptors. Characterization using an integrated approach. *Ann N Y Acad Sci* 812, 216-217.

Emerit, M.B., Miquel, M.C., Gozlan, H., and Hamon, M. (1991). The GTP-insensitive component of high-affinity [³H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin binding in the rat hippocampus corresponds to an oxidized state of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor. *J Neurochem* 56, 1705-1716.

Errico, M., Crozier, R.A., Plummer, M.R., and Cowen, D.S. (2001). 5-HT₇ receptors activate the mitogen activated protein kinase extracellular signal related kinase in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 102, 361-367.

Fakler, B., and Ruppersberg, J.P. (1996). Functional and molecular diversity classifies the family of inward-rectifier K⁺ channels. *Cell Physiology and Biochemistry* 6, 195-209.

Fargin, A., Raymond, J.R., Lohse, M.J., Kobilka, B.K., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1988). The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. *Nature* 335, 358-360.

Filizola, M., Olmea, O., and Weinstein, H. (2002). Prediction of heterodimerization interfaces of G-protein coupled receptors with a new subtractive correlated mutation method. *Protein Eng* 15, 881-885.

Galvez, T., Duthey, B., Kniazeff, J., Blahos, J., Rovelli, G., Bettler, B., Prezeau, L., and Pin, J.P. (2001). Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J* 20, 2152-2159.

Gaspar, P., Cases, O., and Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* 4, 1002-1012.

Gelernter, J., Rao, P.A., Pauls, D.L., Hamblin, M.W., Sibley, D.R., and Kidd, K.K. (1995). Assignment of the 5HT₇ receptor gene (HTR7) to chromosome 10q and exclusion of genetic linkage with Tourette syndrome. *Genomics* 26, 207-209.

George, S.R., O'Dowd, B.F., and Lee, S.P. (2002). G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 1, 808-820.

Goldman, D.E. (1943). Potential, impedance, and rectification in membranes. *J Gen Physiology* 27, 37-60.

Goldstein, S.A., Bockenhauer, D., O'Kelly, I., and Zilberberg, N. (2001). Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* 2, 175-184.

Goldstein, S.A., Price, L.A., Rosenthal, D.N., and Pausch, M.H. (1996). ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13256-13261.

Gouldson, P.R., Dean, M.K., Snell, C.R., Bywater, R.P., Gkoutos, G., and Reynolds, C.A. (2001). Lipid-facing correlated mutations and dimerization in G-protein coupled receptors. *Protein Eng* 14, 759-767.

Graeff, F.G., Guimaraes, F.S., De Andrade, T.G., and Deakin, J.F. (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav* 54, 129-141.

Gross, C., Zhuang, X., Stark, K., Ramboz, S., Oosting, R., Kirby, L., Santarelli, L., Beck, S., and Hen, R. (2002). Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 416, 396-400.

Guscott, M., Bristow, L.J., Hadingham, K., Rosahl, T.W., Beer, M.S., Stanton, J.A., Bromidge, F., Owens, A.P., Huscroft, I., Myers, J., *et al.* (2005). Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT7 receptor suggest therapeutic potential in depression. *Neuropharmacology* 48, 492-502.

Gustafson, E.L., Durkin, M.M., Bard, J.A., Zgombick, J., and Branchek, T.A. (1996). A receptor autoradiographic and in situ hybridization analysis of the distribution of the 5-HT7 receptor in rat brain. *Br J Pharmacol* 117, 657-666.

Gutman, G.A., Chandy, K.G., Adelman, J.P., Aiyar, J., Bayliss, D.A., Clapham, D.E., Covarrubias, M., Desir, G.V., Furuichi, K., Ganetzky, B., *et al.* (2003). International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 55, 583-586.

Hague, C., Hall, R.A., and Minneman, K.P. (2004). Olfactory receptor localization and function: an emerging role for GPCR heterodimerization. *Mol Interv* 4, 321-322.

Hedlund, P.B., and Sutcliffe, J.G. (2004). Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT7 receptor research. *Trends Pharmacol Sci* 25, 481-486.

Heidmann, D.E., Metcalf, M.A., Kohen, R., and Hamblin, M.W. (1997). Four 5-hydroxytryptamine7 (5-HT7) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *J Neurochem* 68, 1372-1381.

Henry, D.J., and Chavkin, C. (1995). Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* 186, 91-94.

Henry, D.J., Grandy, D.K., Lester, H.A., Davidson, N., and Chavkin, C. (1995). Kappa-opioid receptors couple to inwardly rectifying potassium channels when coexpressed by *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* 47, 551-557.

Hirst, W.D., Price, G.W., Rattray, M., and Wilkin, G.P. (1997). Identification of 5-hydroxytryptamine receptors positively coupled to adenylyl cyclase in rat cultured astrocytes. *Br J Pharmacol* 120, 509-515.

Ho, B.Y., Karschin, A., Branchek, T., Davidson, N., and Lester, H.A. (1992). The role of conserved aspartate and serine residues in ligand binding and in function of the 5-HT_{1A} receptor: a site-directed mutation study. *FEBS Lett* 312, 259-262.

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., and Katz, B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116, 424-448.

Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R., and Humphrey, P.P. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46, 157-203.

Hoyer, D., Hannon, J.P., and Martin, G.R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71, 533-554.

Huang, C., Ma, W., Ding, M., Bowden, G.T., and Dong, Z. (1997). Direct evidence for an important role of sphingomyelinase in ultraviolet-induced activation of c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 272, 27753-27757.

Ilan, N., and Goldstein, S.A. (2001). Kcnko: single, cloned potassium leak channels are multi-ion pores. *Biophys J* 80, 241-253.

Inanobe, A., Ito, H., Ito, M., Hosoya, Y., and Kurachi, Y. (1995). Immunological and physical characterization of the brain G protein-gated muscarinic potassium channel. *Biochem Biophys Res Commun* 217, 1238-1244.

Isomoto, S., Kondo, C., and Kurachi, Y. (1997). Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function. *Jpn J Physiol* 47, 11-39.

Issafras, H., Angers, S., Bulenger, S., Blanpain, C., Parmentier, M., Labbe-Jullie, C., Bouvier, M., and Marullo, S. (2002). Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J Biol Chem* 277, 34666-34673.

Jenkinson, D.H. (2006). Potassium channels--multiplicity and challenges. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S63-71.

Jordan, B.A., and Devi, L.A. (1999). G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399, 697-700.

Kammerer, R.A., Frank, S., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., and Engel, J. (1999). Heterodimerization of a functional GABAB receptor is mediated by parallel coiled-coil alpha-helices. *Biochemistry* 38, 13263-13269.

Karschin, A. (1999). G Protein Regulation of Inwardly Rectifying K(+) Channels. *News Physiol Sci* 14, 215-220.

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

Karschin, C., Schreibmayer, W., Dascal, N., Lester, H., Davidson, N., and Karschin, A. (1994). Distribution and localization of a G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channel in the rat. *FEBS Lett* 348, 139-144.

Karschin, C., Wischmeyer, E., Preisig-Muller, R., Rajan, S., Derst, C., Grzeschik, K.H., Daut, J., and Karschin, A. (2001). Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K(+) channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system. *Mol Cell Neurosci* 18, 632-648.

Katz, B. (1949). The efferent regulation of the muscle spindle in the frog. *J Exp Biol* 26, 201-217.

Kaykas, A., Yang-Snyder, J., Heroux, M., Shah, K.V., Bouvier, M., and Moon, R.T. (2004). Mutant Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the endoplasmic reticulum by oligomerization. *Nat Cell Biol* 6, 52-58.

Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., and Goldstein, S.A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376, 690-695.

Kindler, C.H., Pietruck, C., Yost, C.S., Sampson, E.R., and Gray, A.T. (2000). Localization of the tandem pore domain K⁺ channel TASK-1 in the rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 80, 99-108.

Kirchgessner, A.L., Liu, M.T., Howard, M.J., and Gershon, M.D. (1993). Detection of the 5-HT_{1A} receptor and 5-HT_{1A} receptor mRNA in the rat bowel and pancreas: comparison with 5-HT_{1P} receptors. *J Comp Neurol* 327, 233-250.

Kniazeff, J., Bessis, A.S., Maurel, D., Ansanay, H., Prezeau, L., and Pin, J.P. (2004). Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity. *Nat Struct Mol Biol* 11, 706-713.

Kobe, F., Renner, U., Woehler, A., Wlodarczyk, J., Papusheva, E., Bao, G., Zeug, A., Richter, D.W., Neher, E., and Ponimaskin, E. (2008). Stimulation- and palmitoylation-dependent changes in oligomeric conformation of serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1503-1516.

Kobilka, B.K., Frielle, T., Collins, S., Yang-Feng, T., Kobilka, T.S., Francke, U., Lefkowitz, R.J., and Caron, M.G. (1987). An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature* 329, 75-79.

Kovoor, A., Henry, D.J., and Chavkin, C. (1995). Agonist-induced desensitization of the mu opioid receptor-coupled potassium channel (GIRK1). *J Biol Chem* 270, 589-595.

Krapivinsky, G., Gordon, E.A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E. (1995). The G-protein-gated atrial K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁽⁺⁾-channel proteins. *Nature* 374, 135-141.

Krapivinsky, G., Kennedy, M.E., Nemeč, J., Medina, I., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E. (1998). G β binding to GIRK4 subunit is critical for G protein-gated K⁺ channel activation. *J Biol Chem* 273, 16946-16952.

Krishnamurthy, N., Brown, D.P., Kirshner, D., and Sjolander, K. (2006). PhyloFacts: an online structural phylogenomic encyclopedia for protein functional and structural classification. *Genome Biol* 7, R83.

Kristiansen, K. (2004). Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 103, 21-80.

Kroeger, K.M., and Eidne, K.A. (2004). Study of G-protein-coupled receptor-protein interactions by bioluminescence resonance energy transfer. *Methods Mol Biol* 259, 323-333.

Kroeger, K.M., Pflieger, K.D., and Eidne, K.A. (2003). G-protein coupled receptor oligomerization in neuroendocrine pathways. *Front Neuroendocrinol* 24, 254-278.

Kubo, Y., Reuveny, E., Slesinger, P.A., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1993). Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* 364, 802-806.

Kung, M.P., Zhuang, Z.P., Frederick, D., and Kung, H.F. (1994). In vivo binding of [¹²³I]4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2'-(N-2"-pyridinyl)-p-iodobenzamido]-ethylpiperazine, p-MPPI, to 5-HT_{1A} receptors in rat brain. *Synapse* 18, 359-366.

Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., and Morikawa, K. (2000). Structural basis of

glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407, 971-977.

Langlois, X., el Mestikawy, S., Arpin, M., Triller, A., Hamon, M., and Darmon, M. (1996). Differential addressing of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in transfected LLC-PK1 epithelial cells: a model of receptor targeting in neurons. *Neuroscience* 74, 297-302.

Le Bon, O., Staner, L., Murphy, J.R., Hoffmann, G., Pull, C.H., and Pelc, I. (1997). Critical analysis of the theories advanced to explain short REM sleep latencies and other sleep anomalies in several psychiatric conditions. *J Psychiatr Res* 31, 433-450.

Lee, S.P., O'Dowd, B.F., Ng, G.Y., Varghese, G., Akil, H., Mansour, A., Nguyen, T., and George, S.R. (2000). Inhibition of cell surface expression by mutant receptors demonstrates that D2 dopamine receptors exist as oligomers in the cell. *Mol Pharmacol* 58, 120-128.

Lee, S.P., O'Dowd, B.F., Rajaram, R.D., Nguyen, T., and George, S.R. (2003). D2 dopamine receptor homodimerization is mediated by multiple sites of interaction, including an intermolecular interaction involving transmembrane domain 4. *Biochemistry* 42, 11023-11031.

Leonoudakis, D., Gray, A.T., Winegar, B.D., Kindler, C.H., Harada, M., Taylor, D.M., Chavez, R.A., Forsayeth, J.R., and Yost, C.S. (1998). An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. *J Neurosci* 18, 868-877.

Lesage, F. (2003). Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology* 44, 1-7.

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

Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1996). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J* 15, 1004-1011.

Lesage, F., and Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F793-801.

Lim, N.F., Dascal, N., Labarca, C., Davidson, N., and Lester, H.A. (1995). A G protein-gated K channel is activated via beta 2-adrenergic receptors and G beta gamma subunits in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 105, 421-439.

Liu, C., Au, J.D., Zou, H.L., Cotten, J.F., and Yost, C.S. (2004). Potent activation of the human tandem pore domain K channel TRESK with clinical concentrations of volatile anesthetics. *Anesth Analg* 99, 1715-1722, table of contents.

Löffler, G. (2005). *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, 6., komplett überarb. u. aktualis. Aufl. edn (Heidelberg, Springer).

Lotshaw, D.P. (1997). Characterization of angiotensin II-regulated K⁺ conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *J Membr Biol* 156, 261-277.

Lovenberg, T.W., Baron, B.M., de Lecea, L., Miller, J.D., Prosser, R.A., Rea, M.A., Foye, P.E., Racke, M., Slone, A.L., Siegel, B.W., *et al.* (1993). A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron* 11, 449-458.

Maggio, R., Vogel, Z., and Wess, J. (1993). Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3103-3107.

Maingret, F., Patel, A.J., Lazdunski, M., and Honore, E. (2001). The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K⁺ channel TASK-1. *EMBO J* 20, 47-54.

Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2000). A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27, 97-106.

Marshall, F.H., Jones, K.A., Kaupmann, K., and Bettler, B. (1999a). GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci* 20, 396-399.

Marshall, F.H., White, J., Main, M., Green, A., and Wise, A. (1999b). GABA(B) receptors function as heterodimers. *Biochem Soc Trans* 27, 530-535.

Millar, I.D., Bruce, J., and Brown, P.D. (2007). Ion channel diversity, channel expression and function in the choroid plexuses. *Cerebrospinal Fluid Res* 4, 8.

Miquel, M.C., Doucet, E., Riad, M., Adrien, J., Verge, D., and Hamon, M. (1992). Effect of the selective lesion of serotonergic neurons on the regional distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 14, 357-362.

Nandam, L.S., Jhaveri, D., and Bartlett, P. (2007). 5-HT₇, neurogenesis and antidepressants: a promising therapeutic axis for treating depression. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 546-551.

Nelson, C.S., Marino, J.L., and Allen, C.N. (1996). Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. *Neuroreport* 7, 717-720.

O'Connell, A.D., Morton, M.J., and Hunter, M. (2002). Two-pore domain K⁺ channels-molecular sensors. *Biochim Biophys Acta* 1566, 152-161.

Obosi, L.A., Hen, R., Beadle, D.J., Bermudez, I., and King, L.A. (1997). Mutational analysis of the mouse 5-HT₇ receptor: importance of the third intracellular loop for receptor-G-protein interaction. *FEBS Lett* 412, 321-324.

Okuhara, D.Y., and Beck, S.G. (1994). 5-HT_{1A} receptor linked to inward-rectifying potassium current in hippocampal CA3 pyramidal cells. *J Neurophysiol* 71, 2161-2167.

Overton, M.C., Chinault, S.L., and Blumer, K.J. (2003). Oligomerization, biogenesis, and signaling is promoted by a glycoporphin A-like dimerization motif in transmembrane domain 1 of a yeast G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 278, 49369-49377.

Palacios, J.M., Waeber, C., Hoyer, D., and Mengod, G. (1990). Distribution of serotonin receptors. *Ann N Y Acad Sci* 600, 36-52.

Pfaff, T., and Karschin, A. (1997). Expression cloning of rat cerebellar adenosine A₁ receptor by coupling to Kir channels. *Neuroreport* 8, 2455-2460.

Plant, L.D., Rajan, S., and Goldstein, S.A. (2005). K_{2P} channels and their protein partners. *Curr Opin Neurobiol* 15, 326-333.

Pongs, O. (1993). Structure-function studies on the pore of potassium channels. *J Membr Biol* 136, 1-8.

Prinster, S.C., Hague, C., and Hall, R.A. (2005). Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev* 57, 289-298.

Prosser, R.A., Dean, R.R., Edgar, D.M., Heller, H.C., and Miller, J.D. (1993). Serotonin and the mammalian circadian system: I. In vitro phase shifts by serotonergic agonists and antagonists. *J Biol Rhythms* 8, 1-16.

Pucadyil, T.J., Kalipatnapu, S., and Chattopadhyay, A. (2004). The Serotonin 1A Receptor: A Representative Member of the Serotonin Receptor Family. *Cellular and Molecular Neurobiology* 25, 553-580.

Radja, F., Daval, G., Hamon, M., and Verge, D. (1992). Pharmacological and physicochemical properties of pre-versus postsynaptic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor binding sites in the rat brain: a quantitative autoradiographic study. *J Neurochem* 58, 1338-1346.

Ramsay, D., Kellett, E., McVey, M., Rees, S., and Milligan, G. (2002). Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-protein-coupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): hetero-oligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences. *Biochem J* 365, 429-440.

Rapport, M.M., Green, A.A., and Page, I.H. (1948). Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* 176, 1243-1251.

Ray, K., Hauschild, B.C., Steinbach, P.J., Goldsmith, P.K., Hauache, O., and Spiegel, A.M. (1999). Identification of the cysteine residues in the amino-terminal extracellular domain of the human Ca²⁺ receptor critical for dimerization. Implications for function of monomeric Ca²⁺ receptor. *J Biol Chem* 274, 27642-27650.

Raymond, J.R., Kim, J., Beach, R.E., and Tisher, C.C. (1993). Immunohistochemical mapping of cellular and subcellular distribution of 5-HT_{1A} receptors in rat and human kidneys. *Am J Physiol* 264, F9-19.

Raymond, J.R., Mukhin, Y.V., Gelasco, A., Turner, J., Collinsworth, G., Gettys, T.W., Grewal, J.S., and Garnovskaya, M.N. (2001). Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* 92, 179-212.

Reggio, P.H. (2006). Computational methods in drug design: modeling G protein-coupled receptor monomers, dimers, and oligomers. *AAPS J* 8, E322-336.

Rios, C.D., Jordan, B.A., Gomes, I., and Devi, L.A. (2001). G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol Ther* 92, 71-87.

Sakmann, B., and Trube, G. (1984). Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J Physiol* 347, 641-657.

Salahpour, A., Angers, S., Mercier, J.F., Lagace, M., Marullo, S., and Bouvier, M. (2004). Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J Biol Chem* 279, 33390-33397.

Salim, K., Fenton, T., Bacha, J., Urien-Rodriguez, H., Bonnert, T., Skynner, H.A., Watts, E., Kerby, J., Heald, A., Beer, M., *et al.* (2002). Oligomerization of G-protein-coupled receptors shown by selective co-immunoprecipitation. *J Biol Chem* 277, 15482-15485.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.

Schmidt, R.F., Thews, G., and Lang, F. (2000). *Physiologie des Menschen*, 28., korr. und aktual. Aufl. edn (Berlin, Springer).

Schoeffter, P., Ullmer, C., Bobirnac, I., Gabbiani, G., and Lubbert, H. (1996). Functional, endogenously expressed 5-hydroxytryptamine 5-HT₇ receptors in human vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 117, 993-994.

Schoneberg, T., Liu, J., and Wess, J. (1995). Plasma membrane localization and functional rescue of truncated forms of a G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 270, 18000-18006.

Shen, Y., Monsma, F.J., Jr., Metcalf, M.A., Jose, P.A., Hamblin, M.W., and Sibley, D.R. (1993). Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *J Biol Chem* 268, 18200-18204.

Silbernagl, S., and Despopoulos, A. (2007). *Taschenatlas Physiologie*, 7., vollst. überarb. und erw. Aufl. edn (Stuttgart, Georg Thieme).

Slesinger, P.A., Reuveny, E., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1995). Identification of structural elements involved in G protein gating of the GIRK1 potassium channel. *Neuron* 15, 1145-1156.

Sodickson, D.L., and Bean, B.P. (1996). GABAB receptor-activated inwardly rectifying potassium current in dissociated hippocampal CA3 neurons. *J Neurosci* 16, 6374-6385.

Spauschus, A., Lentjes, K.U., Wischmeyer, E., Dissmann, E., Karschin, C., and Karschin, A. (1996). A G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel (GIRK4) from human hippocampus associates with other GIRK channels. *J Neurosci* 16, 930-938.

Sprouse, J.S., and Aghajanian, G.K. (1988). Responses of hippocampal pyramidal cells to putative serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists: a comparative study with dorsal raphe neurons. *Neuropharmacology* 27, 707-715.

Strathmann, M., Wilkie, T.M., and Simon, M.I. (1989). Diversity of the G-protein family: sequences from five additional alpha subunits in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7407-7409.

Talley, E.M., Lei, Q., Sirois, J.E., and Bayliss, D.A. (2000). TASK-1, a two-pore domain K⁺ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron* 25, 399-410.

Terrillon, S., Durroux, T., Mouillac, B., Breit, A., Ayoub, M.A., Taulan, M., Jockers, R., Barberis, C., and Bouvier, M. (2003). Oxytocin and vasopressin V_{1a} and V₂ receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol* 17, 677-691.

Twarog, B.M., and Page, I.H. (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* 175, 157-161.

Wang, W., Sackin, H., and Giebisch, G. (1992). Renal potassium channels and their regulation. *Annu Rev Physiol* 54, 81-96.

Wischmeyer, E. (1997). Klonierung und heterologe Expression G- Proteingekoppelter, einwärtsgerichteter Kaliumkanäle (Göttingen, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie).

Wischmeyer, E., Doring, F., Spauschus, A., Thomzig, A., Veh, R., and Karschin, A. (1997). Subunit interactions in the assembly of neuronal Kir3.0 inwardly rectifying K⁺ channels. *Mol Cell Neurosci* 9, 194-206.

Xie, Z., Lee, S.P., O'Dowd, B.F., and George, S.R. (1999). Serotonin 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors form homodimers when expressed alone and heterodimers when co-expressed. *FEBS Lett* 456, 63-67.

Yang, J., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1995). Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron* 15, 1441-1447.

Yates, M., and Ferrier, I.N. (1990). 5-HT_{1A} Receptors in major depression. *J of Psychopharmacology* 4, 69-74.

Yellen, G., Jurman, M.E., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1991). Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science* 251, 939-942.

Zawarynski, P., Talerico, T., Seeman, P., Lee, S.P., O'Dowd, B.F., and George, S.R. (1998). Dopamine D2 receptor dimers in human and rat brain. *FEBS Lett* 441, 383-386.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Modell eines 7- Helix- Rezeptors	3
Abb. 2: Phylogenetischer Stammbaum der K2P- Kanäle	12
Abb. 3: Aufbau der K2P- Kanäle	13
Abb. 4: Phylogenetischer Stammbaum der Kir- Kanäle	17
Abb. 5: Modell eines Kir- Kanals	17
Abb. 6: Präparation der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	43
Abb. 7: Methode der Zwei-Elektroden- Spannungsklemme	44
Abb. 8: Messprotokolle	47
Abb. 9: Die aktivierende Wirkung von Serotonin (5 HT) auf die GIRK 1/2 Kanalaktivität.....	50
Abb. 10: Basal- und rezeptorinduzierter Strom bei der Expression von [5- HT _{1A} +5-HT ₇]-R	54
Abb. 11: Konzentrations-abhängigkeit der GIRK- Stromstärke des Rezeptor- heterodimers von der Konzen-tration des 5-HT ₇ Rezeptors.....	57
Abb. 12: Vergleich der Koexpressionen verschiedener GPCRs zu [5-HT _{1A} – GIRK 1/2]-SK.....	61
Abb. 13: Untersuchung des Einflusses von Clozapin	64
Abb. 14: Überprüfung der Desensitierung der 5-HT Wirkung.....	66
Abb. 15: Fluoreszenzmessung an GFP- GIRK 1/2.....	68
Abb. 16: Vergleich der Intensität der Membranfluoreszenz von GFP- GIRK 1/2 bei unterschiedlichen GPCR- Koexpressionen.....	70
Abb. 17: Basal- und rezeptorinduzierter Strom des Expressionssystems [5-HT ₇ – TASK-1]-SK.....	73
Abb. 18: Effekte von Isoprenalin auf TASK-1 – β 1	77
Abb. 19: Inhibition des TASK-1 Stroms durch Koexpression von 5-HT _{1A} zu [5- HT ₇ – TASK-1]-SK.....	80

All denjenigen gebührend zu danken, die Ihren Anteil daran hatten, dass diese Arbeit gelingen konnte, ist fast unmöglich, speziell alle zu nennen, die es verdient hätten. Es sei ausdrücklich allen von Herzen gedankt, die mir – selbst wenn sie es nicht wissen sollten – geholfen haben, mein Studium und diese Arbeit zu meistern. Nennen möchte ich an dieser Stelle

Meine Familie

Rainer und Johannes

Mein Physio-Team: Erhard, Frank, Tanja, Brigitte, Maria, Susann, Maru und Biggi

Prof. Th. Schiebler

November 2010