

Aus dem Physiologischen Institut  
der Universität Würzburg  
- Schwerpunkt Neurophysiologie -  
Vorstand: Prof. Dr. M. Heckmann

## **Interaktion von Kir2-Kanälen mit 7-Helix-Rezeptoren**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Lorenz Fuchs**

aus Alzenau

Würzburg, August 2009

**Referent:** Prof. Dr. E. Wischmeyer

**Korreferent:** Priv.-Doz. Dr. S. Maier

**Dekan:** Prof. Dr. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 19.10.2009

**Der Promovend ist Arzt.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Grundlagen zellulärer Erregbarkeit .....	1
1.2 Kaliumkanäle .....	2
1.3 Einteilung der Kir-Kanäle.....	5
1.4 Funktionen von Kir-Kanälen .....	7
1.5 Rezeptoren .....	8
1.5.1 Intrazelluläre Rezeptoren .....	8
1.5.2 Membranständige Rezeptoren .....	9
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	11
<b>2. Material und Methoden</b> .....	13
2.1 Xenopus-Oozyten als heterologes Expressionssystem .....	13
2.1.1 Entnahme und Aufbereitung der Oozyten .....	13
2.1.2 RNA-Injektion .....	13
2.1.3 Verwendete RNA.....	14
2.2 Lösungen und Transmitter .....	15
2.2.1 Badlösung zur Aufbewahrung der Oozyten .....	15
2.2.2 Messlösungen .....	15
2.2.3 Rezeptoragonisten .....	17
2.3 Elektrophysiologische Messungen .....	17
2.3.1 Methode der „Zwei-Elektroden-Spannungsklemme“.....	17
2.3.2 Aufbau des Messstandes .....	18
2.3.3 Herstellung der Elektroden .....	19
2.3.4 Verwendete Messprotokolle .....	19
2.4 Statistische Auswertung .....	22
<b>3. Ergebnisse</b> .....	24
3.1 Spezifität der Interaktion zwischen Rezeptor und Kir2-Kanälen .....	24
3.1.1 Koexpression von Kir2.3 mit dem M1-Acetylcholinrezeptor .....	24
3.1.2 Koexpression von Kir2.1, 2.2 und 2.4 mit dem M1-Acetylcholinrezeptor.....	28

3.1.3	Koexpression von Kir2.1-Kir2.4 mit anderen G <sub>q</sub> -gekoppelten Rezeptoren .....	30
3.2	Mutation einer potentiellen Bindestelle in Kir2.3 .....	32
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>34</b>
4.1	Intrazelluläre Signalwege der Kir2-Regulation .....	34
4.1.1	Kanalphosphorylierung durch PKC .....	34
4.1.2	Einfluss von Ca <sup>2+</sup> -Ionen.....	35
4.1.3	Einfluss von Mg <sup>2+</sup> -Ionen .....	36
4.1.4	Einfluss der GTPase Rho .....	37
4.1.5	Regulation durch PIP <sub>2</sub> .....	37
4.2	Rezeptor- und Kanalspezifität der Inhibition von Kir2 .....	38
4.3	Ausschluss einer Rezeptorinternalisierung .....	39
4.4	Verteilung und Funktion von Kir-Kanälen im Säugerhirn .....	40
4.5	Mögliche Funktion von Kir-Kanälen im Herz .....	41
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>43</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>44</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ATP</b>	Adenosin-5'-triphosphat
<b>cAMP</b>	cyclisches Adenosinmonophosphat
<b>DAG</b>	Diacylglycerin
<b>EC<sub>x</sub></b>	Effektiv-Konzentration (x % des maximalen Effektes)
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositoltriphosphat
<b>μA</b>	Mikroampère
<b>μM</b>	μmol/l
<b>nA</b>	Nanoampère
<b>n<sub>H</sub></b>	Hill-Koeffizient
<b>nM</b>	nmol/l
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositoldiphosphat
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PMA</b>	Phorbol-12-myristat-13-acetat

Alle weiteren Abkürzungen werden im Text erklärt.



# 1. Einleitung

## 1.1 Grundlagen zellulärer Erregbarkeit

Die molekulare Grundlage für die elektrische Aktivität erregbarer Zellen, zu denen die Nervenzellen, glatte und quergestreifte Muskelzellen sowie die Herzmuskelzellen zählen, ist die unterschiedliche Verteilung von Ionen zwischen Intra- und Extrazellulärraum. So ist beispielsweise die intrazelluläre Konzentration von Kalium-Ionen ( $K^+$ ) in fast allen diesen Zellen mit ca. 120 mmol/l etwa 30mal so hoch wie die Konzentration im Extrazellulärraum. Hauptsächlich in Nervenzellen ist dieser Gradient, der unter Energieverbrauch in Form von ATP von einem Transportprotein, der  $Na^+/K^+$ -ATPase, aufgebaut wird, durch Ladungsverschiebungen entlang des chemischen Gradienten verantwortlich für die Entstehung und Aufrechterhaltung des sogenannten Ruhemembranpotentials, das in den meisten erregbaren Zellen bei etwa -70 mV (intrazelluläre Membran negativ geladen, extrazelluläre Membran positiv geladen) liegt und Voraussetzung für die Auslösung eines Aktionspotentials ist.

Während eines Aktionspotentials kommt es zu einem Fluss von Ionen über die Zellmembran und dadurch zu charakteristischen Änderungen des Membranpotentials, wobei hier außer  $K^+$ -Ionen auch  $Na^+$ - und - vor allem in Herzmuskelzellen -  $Ca^{2+}$ -Ionen beteiligt sind (Klinke, Pape, Silbernagl, 2005).

Diese Ionenströme erfolgen passiv entlang des elektrochemischen Gradienten für das jeweilige Ion. Da die Doppellipidschicht der Zellmembran für Ionen nicht permeabel ist, sind für die Diffusion von Ionen durch die Zellmembran spezielle „Tunnel“proteine notwendig, sogenannte Ionenkanäle. Ionenkanäle können entweder selektiv eine bestimmte Ionenart leiten (Natriumkanäle, Kaliumkanäle etc.), es existieren aber auch unspezifische Kanäle wie zum Beispiel die Kationenkanäle der TRP-Familie mit ähnlichen Leitfähigkeiten für Natrium-, Kalium- und Calciumionen (Montell, 2005).

Neben der Generierung von Aktionspotentialen erfüllen Ionenkanäle auch noch weitreichende für den Stoffwechsel ebenfalls wichtige Funktionen in so gut wie

allen Zellen des menschlichen Körpers, auch in nicht elektrisch erregbaren. Für ihre Funktion ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Leitfähigkeit, das heißt vor allem die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle, reguliert werden kann. Nach ihrer Funktionsweise lassen sich Ionenkanäle grundsätzlich in drei Gruppen einteilen: Spannungsgesteuerte Ionenkanäle öffnen in Abhängigkeit vom Membranpotential, ligandengesteuerte Ionenkanäle öffnen bei Bindung bestimmter chemischer Moleküle und mechanisch gesteuerte Ionenkanäle öffnen auf einen mechanischen Reiz an der Zelloberfläche hin (Hille, 2001).

## **1.2 Kaliumkanäle**

Entwicklungsbiologisch gesehen stammen die Kaliumkanäle von einer gemeinsamen Urform ab (Derst & Karschin, 1998). Da sie sowohl in erregbaren als auch in nicht erregbaren Zellen an einer Vielzahl von Aufgaben, wie z.B. der Osmoregulation, Signaltransduktion oder der Regulation des Membranpotentials beteiligt sind, hat sich für diese unterschiedlichen Funktionen eine Vielfalt an Kaliumkanälen entwickelt. Das menschliche Genom besitzt allein mindestens 75 Gene, die für Kaliumkanäle bzw. einzelne Untereinheiten von diesen codieren (Jenkinson, 2006). Die Erzeugung mehrerer Transkripte von einem Gen mittels alternativen Spleißens oder die Zusammenlagerung unterschiedlicher Untereinheiten erhöht die funktionelle Vielfalt nochmals (Wickman et al., 2001).

Heute lassen sich in der Gruppe der Kaliumkanäle unter anderem die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle ( $K_V$ ), die calciumaktivierten Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ), die einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle ( $K_{ir}$ ) sowie die Tandemporenkanäle ( $K_{2P}$ ) unterscheiden.

Ein funktionsfähiger Kaliumkanal besteht immer aus mehreren - gleichartigen oder verschiedenen - Untereinheiten. Die wohl bekanntesten Kaliumkanäle, die spannungsabhängigen  $K_V$ -Kanäle, bestehen aus 4 gleichartigen Untereinheiten, wobei jede Untereinheit 6 helikal die Zellmembran durchspannende Segmente besitzt, die sogenannten Transmembrandomänen M1 - M6. Charakteristisch für

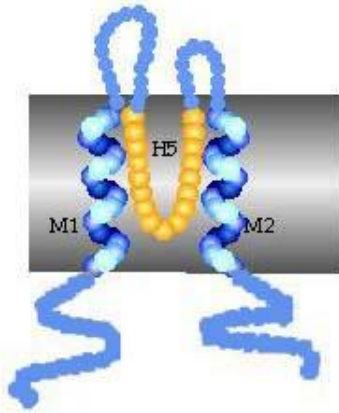
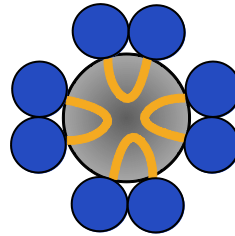


die spannungsabhängigen Kaliumkanäle ist, dass bestimmte positiv geladene Aminosäuren im Transmembransegment M4 als Spannungssensor fungieren. Eine Änderung des Membranpotentials, beispielsweise eine Depolarisation, führt über eine Konformationsänderung zur Öffnung des  $K_V$ -Kanals. Dieser Mechanismus spielt besonders beim Ablauf eines Aktionspotentials eine wichtige Rolle. Nachdem die Zelle am Beginn eines Aktionspotentials durch die Öffnung der spannungsabhängigen Natriumkanäle und den dadurch verbundenen Einstrom von  $Na^+$ -Ionen depolarisiert wurde, sorgt unter anderem die Öffnung der spannungsabhängigen  $K_V$ -Kanäle und der dadurch ermöglichte Ausstrom von  $K^+$ -Ionen für die Repolarisation (Klinke, Pape, Silbernagl, 2005).

Alle Kaliumkanäle besitzen in der P-Domäne, der Porenregion, welche sich bei den  $K_V$ -Kanälen zwischen den Transmembrandomänen M5 und M6 befindet, eine hoch konservierte Aminosäuresequenz um ein G-Y-G-Motiv; es konnte gezeigt werden, dass diese Sequenz für die Kaliumselektivität der Kanäle verantwortlich ist (Doyle et al., 1998).

Einen ähnlichen Aufbau wie die spannungsabhängigen  $K_V$ -Kanäle zeigen die calciumaktivierten  $K_{Ca}$ -Kanäle. Auch sie bestehen aus 4 Untereinheiten mit jeweils 6 Transmembrandomänen.

Einen anderen Aufbau als die oben genannten Kanäle zeigen die einwärtsgleichrichtenden (Kir-) Kaliumkanäle. Zwar bestehen sie auch aus 4 Untereinheiten, jedoch besitzt jede Untereinheit nur zwei Transmembrandomänen M1 und M2, die um die porenbildende H5-Domäne angeordnet sind (Abb. 1).

**A****B**

**Abb.1: Aufbau einer Untereinheit eines Kir-Kanals (A) und Tetramerisierung der Untereinheiten zu einem funktionsfähigen Kanal (B)**

Die Kir-Kanäle wurden vor 50 Jahren von Bernard Katz entdeckt, der sie wegen ihrer Eigenschaft, Kaliumionen leichter in die Zelle hinein als heraus zu lassen, als 'anomal gleichrichtend' bezeichnete (im Gegensatz zu den 'normal auswärtsgerichtenden'  $K_V$ -Kanälen). Die charakteristische Strom-Spannungs-Kurve der Kir-Kanäle sieht so aus, dass negativ vom Umkehr- oder Nernst-Potential für  $K^+$  große Einwärtsströme fließen, ca. 50 mV positiv vom Umkehrpotential ist der Stromfluss beinahe null (Abb. 2). Die Tatsache, dass der 'Knick' in der Strom-Spannungskurve, also der Punkt, an dem die Einwärtsgleichrichtung beginnt, abhängig vom Nernst-Potential ist, spricht gegen die Existenz eines echten Spannungssensors wie bei den spannungsabhängigen Kaliumkanälen. Vielmehr wurde gezeigt, dass die Kanalpore bei Depolarisation spannungsabhängig durch  $Mg^{2+}$  und intrazelluläre Polyamine wie z.B. Spermin und Spermidin verstopft wird. Bei Membranpotentialen negativ vom Umkehrpotential werden diese Moleküle jedoch von den einströmenden Kaliumionen verdrängt, woraus das Phänomen der Gleichrichtung in Abhängigkeit vom Membranpotential und vom Umkehrpotential für Kalium resultiert (Ficker et al., 1994).

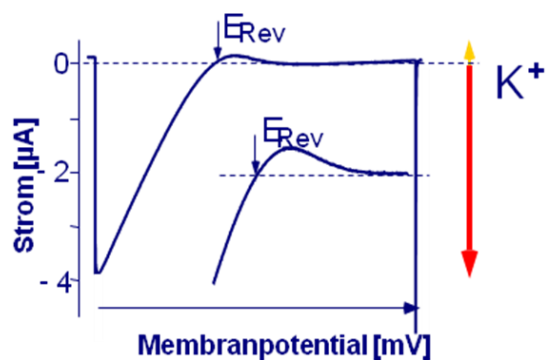
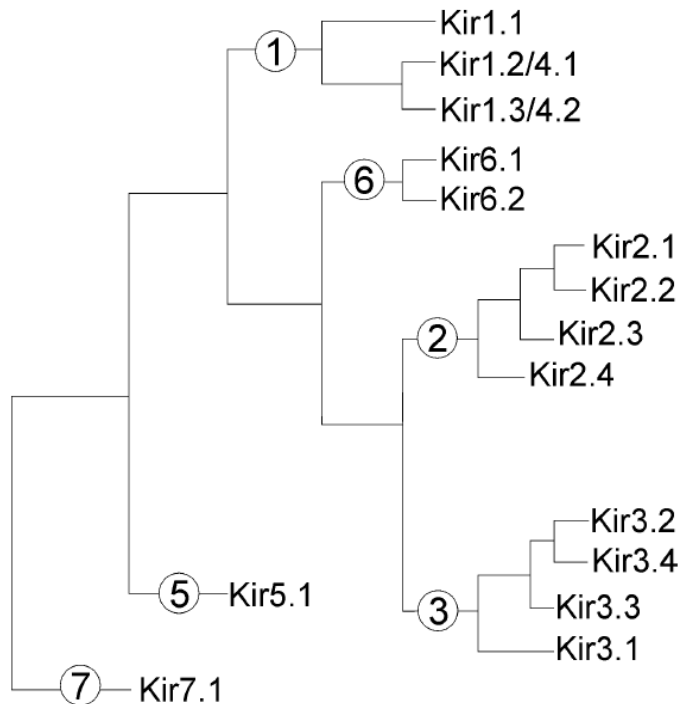


Abb.2: Charakteristische Strom-Spannungs-Kurve eines Kir-Kanals

### 1.3 Einteilung der Kir-Kanäle

Unter Berücksichtigung einer neuen Einteilung werden die Kir-Kanäle derzeit in sieben Unterfamilien - Kir1-Kir7 - mit jeweils mehreren Mitgliedern eingeteilt (Abb. 3). Sequenzanalysen haben ergeben, dass zwischen den einzelnen Unterfamilien eine etwa 30-40%ige genetische Identität besteht. Die einzelnen Mitglieder einer Unterfamilie weisen eine über 60%ige Sequenzhomologie auf (Isomoto et al., 1997).



**Abb.3: Dendrogramm der Kir-Familie (aus: Reimann et al., 1999)**

Die Kanäle der Kir1-Unterfamilie sind hauptsächlich in der Niere exprimiert (Shuck et al., 1997), konnten aber auch im Gehirn nachgewiesen werden. Sie sind - im Gegensatz zu den Kir2-Kanälen - "schwach gleichrichtend" und werden durch den intrazellulären pH-Wert und (ausgenommen Kir1.3) durch zytoplasmatisches ATP reguliert (Karschin et al., 1997).

Die Kir2-Kanäle - als "stark gleichrichtend" bezeichnet - sind hauptsächlich im Herz (Nakamura et al., 1998; Hassinen et al., 2008) und im zentralen Nervensystem exprimiert (Stonehouse et al., 1999) Bisher sind fünf Typen, Kir2.1-Kir2.5, identifiziert.

Die vier Isoformen der Kir3-Familie (früher GIRK für G-Protein-aktivierte Kaliumkanäle) werden durch G-Proteine aktiviert und zwar unter anderem direkt durch deren  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit (Mark et al., 2000). Sie sind besonders häufig im Herz und im Gehirn exprimiert.

Die weitverbreiteten Kir6-Kanäle bilden zusammen mit den Rezeptoren für Sulfonylharnstoffe (SUR) die  $K_{ATP}$ -Kanäle, welche durch intrazelluläres ATP hemmbar sind (Karschin et al., 1997).

## 1.4 Funktionen von Kir-Kanälen

Entsprechend ihres beinahe ubiquitären Vorkommens erfüllen Kir-Kanäle unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Organen und Geweben.

In Kardiomyozyten und anderen erregbaren Zellen sorgen Kir-Kanäle, da sie bei Spannungswerten um das Ruhemembranpotential  $K^+$ -Ionen aus dem Intrazellulärraum nach extrazellulär leiten, für die Stabilisierung des Ruhemembranpotentials. Dieser in Herzmuskelzellen als  $I_{K1}$ -Strom bezeichnete Kaliumauswärtsstrom wird durch Kanäle der Kir2 - Subfamilie vermittelt.

In der Frühphase eines Aktionspotentials, also während der Depolarisation der Zelle, wird die Leitfähigkeit der Kir-Kanäle zunehmend geringer; dadurch ermöglichen sie den Ablauf des Aktionspotentials und verlängern dessen Dauer. In der Spätphase des Aktionspotentials sind die Kir-Kanäle durch erneute Zunahme der Kaliumleitfähigkeit - neben den spannungsabhängigen  $K_V$ -Kanälen und den Tandemporenkanälen ( $K_{2P}$ ) - an der Repolarisation beteiligt (Nakamura et al., 1998).

Auch in nicht elektrisch erregbaren Zellen spielen Kir-Kanäle eine wichtige Rolle. Beispielsweise wird die Insulinsekretion aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas über einen ATP-abhängigen Kaliumkanal ( $K_{ATP}$ ) reguliert, an dessen Aufbau Untereinheiten des Kir6 beteiligt sind (Sakura et al., 1995). Am transepithelialen Ionentransport in der Niere sind hauptsächlich Kanäle der Kir1-Klasse beteiligt (Shuck et al., 1997), wohingegen in histaminsezernierenden Mastzellen die starke Expression von Kanälen der Kir2-Klasse nachgewiesen werden konnte (Wischmeyer et al., 1995).

Einige Erkrankungen in menschlichen bzw. tierischen Organismen sind mit Fehlfunktionen von Kir-Kanälen assoziiert. Der kongenitale Hyperinsulinismus (*Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy*) beruht auf einer autosomal-rezessiven Mutation des Kir6.2-Kanals, welche zu einer exzessiv hohen Insulinsekretion und damit zu Hypoglykämien schon bei Neugeborenen führt (Fournet et al., 2004).

Eine autosomal-rezessiv vererbte Mutation des Kir3.2 liegt bei der sogenannten Weaver-Maus vor. Ein Austausch einer einzigen Aminosäure in der Porenregion führt zu einer verminderten Kaliumselektivität des Kanals. Die Folge dieser Mutation ist eine massive neuronale Degeneration, welche phänotypisch bei den betroffenen Individuen unter anderem zu Tremor und schwerer Ataxie führt (Abraham et al., 1999).

Aus kardiologischer Sicht interessant ist das Andersen- (Tawil-) Syndrom. Diesem Krankheitsbild liegt eine autosomal-dominante Mutation des KCNJ2-Gens zugrunde, welche zu einer verminderten Funktion des Kir2.1-Kanals führt. Die Betroffenen weisen zu einem Großteil ein long-QT-Syndrom auf, welches zu ventrikulären Arrhythmien führen kann. Weitere Folge der durch die Mutation gestörten Kaliumhomöostase sind periodisch auftretende Paralysen sowie eine auffallende Physiognomie mit Merkmalen wie tiefsitzenden Ohren oder Klinodaktylie (Tristani-Firouzi et al., 2002).

## **1.5 Rezeptoren**

Damit Hormone und andere Transmittersubstanzen spezifisch auf ihre jeweiligen Zielzellen wirken können, ist es notwendig, dass die Zielzellen spezifische Rezeptoren, also Bindungsproteine für den jeweiligen Überträgerstoff, aufweisen. Ein Rezeptor kann grundsätzlich auf der Zelloberfläche (membranständige Rezeptoren) oder intrazellulär lokalisiert sein.

### **1.5.1 Intrazelluläre Rezeptoren**

Beispiele für intrazelluläre Rezeptoren sind die Steroidhormonrezeptoren und die Schilddrüsenhormonrezeptoren. Beide Hormone können aufgrund ihrer guten Lipidlöslichkeit leicht durch die Plasmamembran diffundieren. Die Steroidhormone binden im Zytoplasma an ihre jeweiligen Rezeptorproteine, worauf der gesamte Rezeptor-Hormonkomplex nach Abspaltung von

sogenannten Hitzeschockproteinen (HSP), die als Hemmproteine wirken, in den Zellkern wandert und dort die Transkription bestimmter Gene anregt (Induktion). Dies beeinflusst die Expression bestimmter Proteine, was die eigentliche Antwort auf die Hormonwirkung darstellt.

Die Schilddrüsenhormone binden direkt im Zellkern an ihre Rezeptoren (Kernrezeptoren), wobei es sich bei diesen um hormonaktivierte Transkriptionsfaktoren handelt, die ebenfalls in die Proteinbiosynthese eingreifen.

Aufgrund ihrer in die Genexpression eingreifenden Wirkweise der intrazellulären Rezeptoren ist die Zeitdauer zwischen Hormonbindung und Effekt im Gegensatz zu anderen Rezeptoren eher lang, sie liegt im Zeitraum von Minuten und Stunden (Klinke, Pape, Silbernagl, 2005).

### **1.5.2 Membranständige Rezeptoren**

Bei den membranständigen Rezeptoren existieren ebenfalls unterschiedliche Wirkmechanismen. Im einfachsten Fall ist der Rezeptor direkt an einen Ionenkanal gekoppelt, der bei Aktivierung des Rezeptors geöffnet oder geschlossen wird. So sorgt die Bindung von Acetylcholin am nikotinischen Acetylcholinrezeptor unmittelbar für die Erhöhung der Leitfähigkeit für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ .

Andere membranständige Rezeptoren sind nicht an einen Ionenkanal gekoppelt, sondern weisen eine Enzymaktivität auf wie z.B. der Insulinrezeptor, der eine Rezeptor-Tyrosinkinase darstellt und dadurch aktiviert wird, dass sich nach extrazellulärer Bindung von Insulin bestimmte zytosolische Domänen des Rezeptors gegenseitig an ihren Tyrosinresten phosphorylieren. Anschließend erfolgt die Phosphorylierung weiterer zytoplasmatischer Proteine (IRS1 = Insulin receptor substrate 1), was schlussendlich zu den gewünschten Wirkungen von Insulin, z.B. dem Einbau neuer Glukose - Transportmoleküle in

die Zellmembran führt.

Wiederum einen anderen Weg bestreiten die Rezeptoren einer dritten Gruppe membranständiger Rezeptoren, die sogenannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Ihr Name rührt daher, dass eine der 3 Untereinheiten, aus denen das G-Protein besteht, die  $\alpha$ -Untereinheit, in der Lage ist, nach Ankopplung des spezifischen Hormons Guanosin triphosphat (GTP) zu binden, was zur Dissoziation der 3 Untereinheiten führt. Der weitere Signalweg ist nun je nach Rezeptorsubtyp verschieden. Bei den  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren bewirkt die GTP-bindende  $\alpha$ -Untereinheit eine Aktivierung des Enzyms Adenylatcyclase, welche in der Lage ist aus Adenosin triphosphat (ATP) cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) zu bilden. cAMP wiederum bewirkt die Aktivierung einer Proteinkinase vom Typ A (PKA), die durch die Phosphorylierung weiterer Proteine die eigentliche Hormonwirkung auslöst. Zu den  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren gehören beispielsweise die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren, die Serotoninrezeptoren 5-HT<sub>4-7</sub> und der Histamin H<sub>2</sub>-Rezeptor.

Diesem Mechanismus entgegengesetzt wirken die Rezeptoren der  $G_{i/o}$ -Klasse, zu denen die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren M2 und M3, der Dopaminrezeptor D2 und der 5-HT<sub>1</sub>-Serotoninrezeptor gehören. Bei diesen Rezeptoren wirkt die GTP-tragende  $\alpha$ -Untereinheit hemmend auf die Adenylatcyclase, wodurch die Bildung von cAMP vermindert wird.

Die in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren gehören der Familie der  $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren an, die folgenden intrazellulären Signalweg bestreiten (Abb. 4): Die GTP-tragende  $\alpha$ -Untereinheit bewirkt die Aktivierung der Phospholipase C, die wiederum die Umwandlung von Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) katalysiert. IP<sub>3</sub> bewirkt die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern, was direkte Auswirkungen, z.B. auf die Kaliumleitfähigkeit der Zelle, hat und gleichzeitig einen indirekten Effekt durch die Bindung von Ca<sup>2+</sup> an Calmodulin bewirkt. DAG und Ca<sup>2+</sup> aktivieren schließlich gemeinsam die Proteinkinase C (PKC), die ihrerseits weitere Proteine phosphoryliert. Zur Gruppe der  $G_q$ -



gekoppelten Rezeptoren gehören u.a. der  $M_1$ -Acetylcholinrezeptor, der Serotoninrezeptor  $5\text{-HT}_{2C}$ , der Histaminrezeptor  $H_1$  und die Bradykininrezeptoren  $B_1$  und  $B_2$  (Klinke, Pape, Silberagl, 2005).

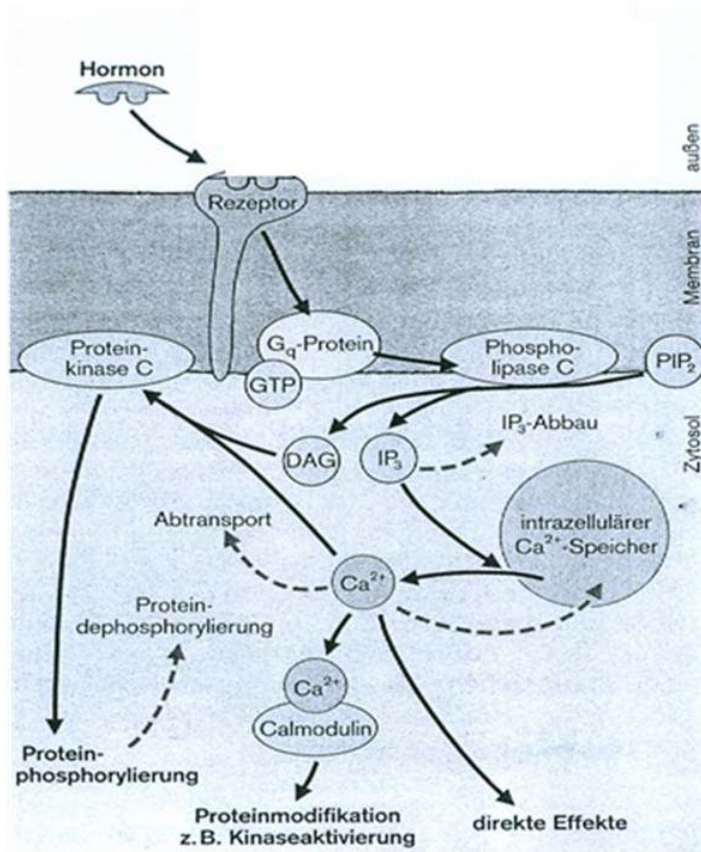


Abb.4: Intrazellulärer Signalweg der  $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren (aus: Klinke, Pape, Silberagl, 2005)

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Frage, wie Kir-Kanäle durch Rezeptoren und intrazelluläre Botenstoffe in ihrer Leitfähigkeit beeinflusst werden können, ist seit Jahren Gegenstand aktueller Forschung. Es konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel Kanäle der Kir2-Familie durch Phosphorylierung durch eine Tyrosinkinase inhibiert (Wischmeyer et al., 1998), Kanäle der Kir3-Familie direkt durch Bindung von  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten aktiviert oder durch Phosphorylierung durch PLC inhibiert werden können (Karschin, 1999).

Es gibt Hinweise in der Literatur, dass die Kanäle der Kir2-Familie ebenfalls durch  $G_q$ -gekoppelte Rezeptoren reguliert sein können, wobei sich zwei Untersuchungen insbesondere in der Frage der Kanalspezifität der Regulation widersprechen (Jones, 1996 / Chuang et al., 1997). Auch der Signalweg ist bis jetzt nicht hinreichend geklärt.

Ziel der Arbeit ist es, systematisch die Interaktion zwischen den Kir-Kanälen Kir2.1-Kir2.4 und fünf verschiedenen  $G_q$ -gekoppelten Rezeptoren zu untersuchen und Hinweise auf mögliche intrazelluläre Signalwege der Interaktion zu finden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Xenopus-Oozyten als heterologes Expressionssystem**

#### **2.1.1 Entnahme und Aufbereitung der Oozyten**

Die Oozyten des afrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* eignen sich wegen der einfachen Handhabung und ihrer niedrigen Dichte an endogenen Kaliumkanälen besonders gut als heterologes Expressionssystem.

Zur Gewinnung der Oozyten wird der weibliche Frosch zunächst anästhesiert, anschließend erfolgt die Eröffnung der Bauchhöhle und die Entfernung der Eischläuche. Nach Naht der Bauchdecke und der Haut wird der Frosch wieder in ein Aquarium verbracht.

Die entnommenen Eischläuche werden ca. 4 Stunden unter kontinuierlicher Rotation in einer Kollagenaselösung belassen, um das zwangsläufig mitentnommene Bindegewebe sowie das Follikelepithel soweit wie möglich zu entfernen. Unter mikroskopischer Kontrolle werden anschließend unbeschädigte Oozyten der Reifestadien IV-VI, gut erkennbar an der unterschiedlichen Farbe beider Zellpole, aussortiert und in eine Petrischale mit Aufbewahrungslösung (ND96 mit Gentamycin und Na<sup>+</sup>-Pyruvat) gelegt. Die weitere Aufbewahrung bis zur RNA-Injektion erfolgt im Kühlschrank für maximal eine Woche. Beschädigte Oozyten werden in regelmäßigen Abständen aussortiert.

#### **2.1.2 RNA-Injektion**

Die Injektion von mRNA in die Oozyten erfolgt unter mikroskopischer Sicht mit Hilfe eines automatischen Nanoliterinjektors (Drummond, Broomwall, USA), der durch einen Mikromanipulator geführt wird. Unmittelbar vor der Injektion werden die dafür benötigten Injektionspipetten aus dünnwandigen Borsilikat-Kapillaren

(3.5“ Drummond, Broomwall, USA) mit Hilfe eines Mikroelektrodenpullers (Micropipette Puller P-97, Sutter Instrument Company, Novato, USA) ausgezogen und an der Spitze gekürzt, so dass eine Öffnungsspitze von etwa 10-15 µm im Durchmesser entsteht. Zur Vermeidung von Luftblasen wird die Pipette mit einer konventionellen Injektionsspritze zur Hälfte mit Paraffinöl gefüllt. Die Pipette wird nun auf den Injektor aufgebracht und die zu injizierende mRNA von einer Petrischale aufgesogen. Anschließend erfolgt die Injektion von jeweils 32,2 nl bis 41,1 nl mRNA pro Oozyte direkt in das Zytoplasma.

Die Oozyten werden nach der Injektion für 24-72 h bei +19°C in Aufbewahrungslösung inkubiert. Für die elektrophysiologischen Messungen werden nur unbeschädigte Oozyten herangezogen.

### 2.1.3 Verwendete RNA

Die Herstellung der verwendeten mRNA erfolgte durch die Mitarbeiter des molekularbiologischen Labors des Physiologischen Institutes der Universität Würzburg. Im Wesentlichen wurden dazu genomische DNA-Sequenzen der zu exprimierenden Kanäle und Rezeptoren mittels PCR amplifiziert und anschließend mithilfe spezifischer Schnittstellen in den polyadenylierten Überexpressionsvektor pSGEM (Hollmann, 1998) hineinkloniert. Im letzten Schritt erfolgt die Transkription der DNA in mRNA durch eine T7-RNA-Polymerase.

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendete mRNA zeigt Tabelle 1.

Kanäle	Rezeptoren
rat Kir2.1 pSGEM	h M <sub>1</sub> ACh pGEM 1
rat Kir2.2 pSGEM	m H <sub>1</sub> pSGEM
rat Kir2.3 pSGEM	5-HT <sub>2C</sub> pSGEM
rat Kir2.3[AAA] pSGEM	m B <sub>1</sub> pSGEM
rat Kir2.4 pSGEM	m B <sub>2</sub> pSGEM

Tab.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendete mRNA

## 2.2 Lösungen und Transmitter

### 2.2.1 Badlösung zur Aufbewahrung der Oozyten

Zur Aufbewahrung der Oozyten wird eine Lösung verwendet, die in ihrer Zusammensetzung im Wesentlichen der Extrazellulärlösung von *Xenopus laevis* entspricht. Zur Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels der Oozyten ist zusätzlich Natriumpyruvat hinzugefügt. Die Beimischung des Antibiotikums Gentamycin soll ein unerwünschtes Wachstum von Bakterien bzw. Pilzen während der Aufbewahrungszeit verhindern. Die genaue Zusammensetzung der Aufbewahrungslösung zeigt Tabelle 2:

NaCl	96 mM
KCl	2 mM
MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	1 mM
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	1 mM
Hepes	5 mM
Natriumpyruvat	2,5 mM
Gentamycin	100 µg/ml
mit 1M NaOH auf pH 7,4 titriert	

Tab.2: Zusammensetzung der Oozyten-Aufbewahrungslösung

### 2.2.2 Messlösungen

Für die Durchführung der Messungen wurden zwei verschiedene Lösungen verwendet. „ND96“ entspricht der oben beschriebenen Aufbewahrungslösung ohne Natriumpyruvat und ohne Antibiotikum, also der Zusammensetzung der Extrazellulärflüssigkeit von *Xenopus laevis*. Der Kaliumgehalt von „ND96“ beträgt 2 mmol/l, bei Verwendung dieser Lösung während einer Messung liegt das Kaliumgleichgewichtspotential (nach der vereinfachten Nernst-Formel berechnet) bei ungefähr -100 mV.

Um im Bereich des physiologischen Membranpotentials bei -70 mV größere Kaliumströme zu messen, wurde eine Extrazellulärlösung mit einer erhöhten Kaliumkonzentration von 96 mmol/l („high-K<sup>+</sup>-Lösung“) verwendet, was in etwa der intrazellulären Kaliumkonzentration der Xenopus-Oozyten entspricht. Dadurch liegt bei Umspülen der Oozyte mit „high-K<sup>+</sup>“ das Kaliumgleichgewichtspotential (wiederum nach der vereinfachten Nernst-Formel berechnet) etwa bei 0 mV.

Die genaue Zusammensetzung von „ND96“ und „high-K<sup>+</sup>“ ist den Tabellen 3 und 4 zu entnehmen. Alle Lösungen wurden zwischen den Messungen im Kühlschrank aufbewahrt und für die Messungen in einem Wasserbad auf Zimmertemperatur erwärmt.

NaCl	96 mM
KCl	2 mM
MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	1 mM
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	1 mM
Hepes	5 mM
mit 1M NaOH auf pH 7,4 titriert	

Tab.3: Zusammensetzung der „ND96“-Lösung

NaCl	2 mM
KCl	96 mM
MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	1 mM
Hepes	5 mM
mit 1M NaOH auf pH 7,4 titriert	

Tab.4: Zusammensetzung der „high-K<sup>+</sup>-Lösung

### 2.2.3 Rezeptoragonisten

Zur Stimulation der koexprimierten Rezeptoren wird der für den jeweils exprimierten Rezeptor physiologische Rezeptoragonist verwendet. Die Agonisten sind in H<sub>2</sub>O gelöst und bei -20°C tiefgefroren. Unmittelbar vor der Messung wird der benötigte Agonist aufgetaut und in gewünschter Konzentration in „high-K<sup>+</sup>“-Lösung gelöst.

Folgende Rezeptoragonisten wurden für diese Arbeit verwendet (Tab. 5):

Substanz	Hersteller
Muskarinchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Deutschland
Histamindihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Deutschland
Serotoninhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Deutschland
Bradykinin Fragment 1-8	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Deutschland

Tab.5: Verwendete Rezeptoragonisten

## 2.3 Elektrophysiologische Messungen

### 2.3.1 Methode der „Zwei-Elektroden-Spannungsklemme“

Alle elektrophysiologischen Messungen in dieser Arbeit wurden mit Hilfe der „Zwei-Elektroden-Spannungsklemme“ durchgeführt. Diese Methode ermöglicht es, Ströme über die gesamte Zellmembran einer Zelle zu messen, wobei das Membranpotential konstant auf einen bestimmten Wert gehalten werden kann. Dies geschieht, indem in die Zelle zwei Elektroden eingebracht werden. Außerhalb der Zelle befinden sich in einer Badlösung zwei weitere (Referenz)elektroden. Die erste Elektrode dient zur Messung des aktuellen Membranpotentials (Ist-Wert), über die andere Elektrode kann Strom in die

Zelle injiziert werden, um das gewünschte Membranpotential (Soll-Wert) zu erreichen. Der Strom, der über die Zellmembran fließt, kann in dieser Versuchsanordnung indirekt gemessen werden, da er genau dem Strom entspricht, der zum Halten eines vorgegebenen Membranpotentials in die Zelle injiziert werden muss.

### **2.3.2 Aufbau des Messstandes**

Zur Durchführung von Messungen mit der „Zwei-Elektroden-Spannungsklemme“ benötigt man mindestens ein Mikroskop zur Betrachtung der Zellen, zwei an Mikromanipulatoren befestigte Elektrodenhalter, einen Verstärker, einen Pulsgenerator sowie einen Computer zur Aufzeichnung der gemessenen Potentiale und Ströme.

Für die Messungen zu dieser Arbeit wurde ein Messstand mit inversem Mikroskop (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet, in dessen Fokusebene eine Messkammer aus Plexiglas mit einer Vertiefung zur Fixierung der zu messenden Oozyte eingelassen ist. Die Messkammer kann über ein Perfusionssystem mit verschiedenen Lösungen gespült werden; überschüssige Flüssigkeit wird kontinuierlich durch eine Pumpe abgesaugt. Zum Ausgleich von Erschütterungen steht diese Einrichtung auf einem schwingungsgedämpften Tisch, welcher zur Abschirmung vor elektromagnetischen Impulsen von einem Faraday-Käfig umgeben ist. Alle metallischen Teile der Messapparatur sind über niederohmige Kabel geerdet.

Ebenfalls auf dem schwingungsgedämpften Tisch montiert sind zwei Säulen, an denen jeweils ein Mikromanipulator mit Elektrodenhalter angebracht ist.

Die Elektroden sind an einen Verstärker (EPC9, HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) sowie einen Pulsgenerator (TURBO TEC-10C, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland) angeschlossen. Als Messcomputer dient ein G4 PowerMac (Apple Computer, Cupertino, Californien, USA), als Messprogramm



HEKA PulseFit v.8.78 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland).

Mit dieser Versuchsanordnung können Ströme über der Oozytenmembran im Bereich von 0,5 - 30  $\mu\text{A}$  gemessen werden.

### **2.3.3 Herstellung der Elektroden**

Für Strom- und Spannungselektroden werden chlorierte Silberdrähte verwendet. Auf die Silberdrähte werden Glaspipetten aufgesetzt; diese werden mit einem Puller (L/M-3P-A; List Medical, Damstadt, Deutschland) in zwei Schritten aus Borsilikatglas mit Filament (GC200F15, Harvard Apparatus, Kent, UK) gezogen. Anschließend wird ihre Spitze an einer Mikroforge abgebrochen, so dass die Spitzenöffnung im Durchmesser etwa 1-3  $\mu\text{m}$  beträgt. Vor dem Aufsetzen auf die Silberelektrode werden die Glaspipetten zur Hälfte mit 3 M KCl-Lösung gefüllt. Der nach Eintauchen der Pipetten in die Badlösung gemessene elektrische Widerstand sollte in einem Bereich von 0,5-2 M $\Omega$  liegen.

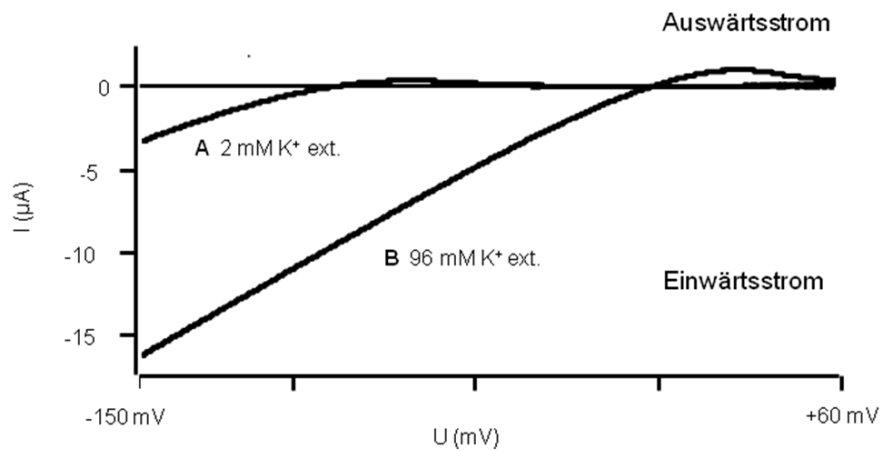
### **2.3.4 Verwendete Messprotokolle**

Nach Kontrolle des elektrischen Widerstandes werden beide Elektroden unter mikroskopischer Sicht in die Oozyte eingebracht. Zur Schonung der Oozyte wird diese sofort anschließend auf ein Membranpotential von -70 mV geklemmt, was in etwa ihrem Ruhemembranpotential entspricht. Hiervon ausgehend können verschiedene Messprotokolle durchgeführt werden.

#### Rampenpuls

Innerhalb von 2000ms wird das Haltepotential kontinuierlich von -150 mV auf 60 mV gesteigert. Diese Depolarisation liefert eine Strom-Spannungs-Kurve (IV-Kurve, Abb. 5), mit der das Vorhandensein des typischen Kir-Stroms geprüft und durch Verwendung von „high-K<sup>+</sup>“-Lösung auch seine K<sup>+</sup>-Selektivität gezeigt

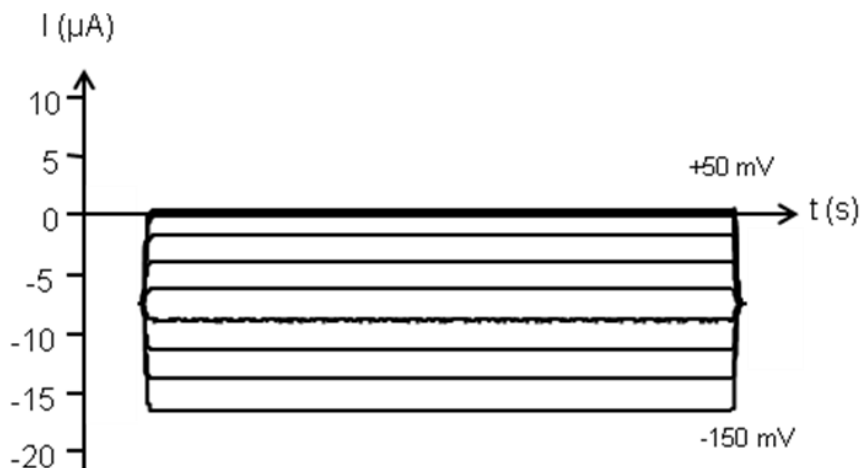
werden kann.



**Abb.5: Strom-Spannungs-Kurve eines einwärtsgerichteten Kaliumkanals mit 2 mmol/l  $\text{K}^+$  ext. (A) und 96 mmol/l  $\text{K}^+$  ext. (B)**

### Spannungssprünge

Die zu messende Zelle wird ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV in Sprüngen von jeweils 20 mV von -150 mV auf +50 mV depolarisiert, wobei jede Stufe 500 ms lang gehalten wird. Die dabei gemessenen Ströme werden übereinander aufgetragen. Eine typische Ableitung eines einwärtsgerichteten Kaliumkanals mit diesem Messmodus zeigt Abbildung 6.



**Abb.6: Einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal im Messmodus „Spannungssprünge“**

#### Langzeitableitung mit -70 mV Haltepotential

Bei diesem Messprotokoll wird das Membranpotential kontinuierlich auf -70 mV geklemmt und der bei diesem Potential abgeleitete Strom über die Zeit aufgetragen. Dieses Messprotokoll eignet sich zur Aufzeichnung und Bestimmung quantitativer Änderungen des Kaliumstroms über einen längeren Zeitraum, etwa durch die Wirkung bestimmter Pharmaka.

Zum Beweis, dass die zu messenden Kir-Kanäle tatsächlich in ausreichendem Maße exprimiert wurden, wurden vor Beginn der Strommessung zuerst Spannungsrampen gefahren und nur dann mit den Messungen fortgefahren, wenn die Rampen die für Kir-Kanäle typische Einwärtsgleichrichtung und außerdem eine ausreichend hohe Stromstärke (mind 0,5  $\mu\text{A}$  bei -70 mV) aufwiesen. Der Beweis für die Anwesenheit des entsprechenden  $G_q$ -gekoppelten Rezeptors konnte in den meisten Fällen durch den nach Aktivierung des Rezeptors auftretenden transienten  $\text{Cl}^-$ -Strom erbracht werden. Dieser Stromfluss wird durch den nach Stimulation von  $G_q$ -gekoppelten Rezeptoren auftretenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einfluss, welcher einen in den Oozyten endogen vorhandenen Chloridstrom (Fuller et al., 2001) aktiviert, getriggert.

## 2.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden die gemessenen Ausgangsstromwerte jeweils gleich 1 (=100 %) gesetzt und die nach Rezeptoraktivierung gemessenen Stromwerte in Relation zu diesem Bezugswert gesetzt. Von diesen so errechneten Werten wurden die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichung berechnet. Alle Mittelwerte wurden mit dem gepaarten t-Test nach Student auf Signifikanz geprüft. Als Signifikanzgrenze wurde  $p < 0,05$  angesehen. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm „Excel“ von Microsoft.

Zur Berechnung der Zeitkonstanten  $\tau$ , einem Maß für die Geschwindigkeit der Kanalinhibition, wurden die Originalableitungen in das Programm IGOR Pro Version 6.03 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) geladen. Mittels exponentiellem Fitting kann der Stromabfall (Inhibition) durch folgende Formel mathematisch beschrieben werden:

$$I(t) = I_s + I_0 \exp(-\tau_0 \cdot t)$$

$I(t)$  = Strom zum Zeitpunkt  $t$

$I_s$  = Steady-State-Strom

$I_0$  = Komponente des Stromabfalls bzw. Stromanstiegs

$\tau_0$  = Zeitkonstante der Inhibition

Zur Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung wurde die maximal erreichbare Kanalinhibition gleich 1 (=100 %) gesetzt und die gemessenen Mittelwerte auf diese Bezugsgröße normiert. Die Dosis-Wirkungs-Kurve lässt sich mit Hilfe einer logistischen Funktion, der Hill-Funktion, beschreiben:

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

$E_{\max}$  = Effekt bei maximaler Konzentration des Rezeptoragonisten

$E_{\min}$  = Effekt bei minimaler Konzentration des Rezeptoragonisten

$EC_{50}$  = Konzentration, bei der ein halb-maximaler Effekt eintritt

$c$  = Konzentration des Rezeptoragonisten

$n_H$  = Hill-Koeffizient

Die Berechnung der Hill-Funktion erfolgte ebenfalls mit dem Programm IGOR Pro Version 6.03. Aus der für jeden Wirkstoff charakteristischen Dosis-Wirkungs-Kurve lassen sich verschiedene wirkstoffspezifische Parameter ableiten: Die  $EC_{50}$ , das heißt die Konzentration, bei der genau die Hälfte des maximalen Effektes erreicht ist, ist ein Maß für die Potenz eines Wirkstoffes. Je niedriger die  $EC_{50}$ , desto potenter ist ein Wirkstoff. Der Hill-Koeffizient  $n_H$  ist eine Maßzahl für die Steilheit der Kurve; er lässt Rückschlüsse auf die Kooperativität der Substratbindung eines Enzyms zu.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Spezifität der Interaktion zwischen Rezeptor und Kir2-Kanälen

Die Kir3-Unterfamilie der einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle (früher GIRK für G-protein-activated-K<sup>+</sup>-channels) wird obligat durch die direkte Bindung der  $\beta\gamma$ -Untereinheit des trimeren G<sub>i/o</sub>-Proteins aktiviert (Karschin, 1999). Es gibt Hinweise in der Literatur, dass auch die stark einwärts gleichrichtenden Kanäle der Kir2-Familie durch G-Proteine der G<sub>q</sub>-Familie reguliert sein können. Dabei widersprechen sich insbesondere zwei Untersuchungen zur Spezifität der Interaktion (Jones, 1996; Chuang et al., 1997). Ebenso ist der intrazelluläre Signalweg bislang nicht hinreichend geklärt.

In dieser Arbeit wurde deshalb zunächst die Interaktion der Kir-Kanäle Kir2.1-Kir2.4 mit dem muskarinischen M1-Rezeptor, einem G<sub>q</sub>-gekoppelten 7-Helix-Rezeptor, untersucht.

#### 3.1.1 Koexpression von Kir2.3 mit dem M1-Acetylcholinrezeptor

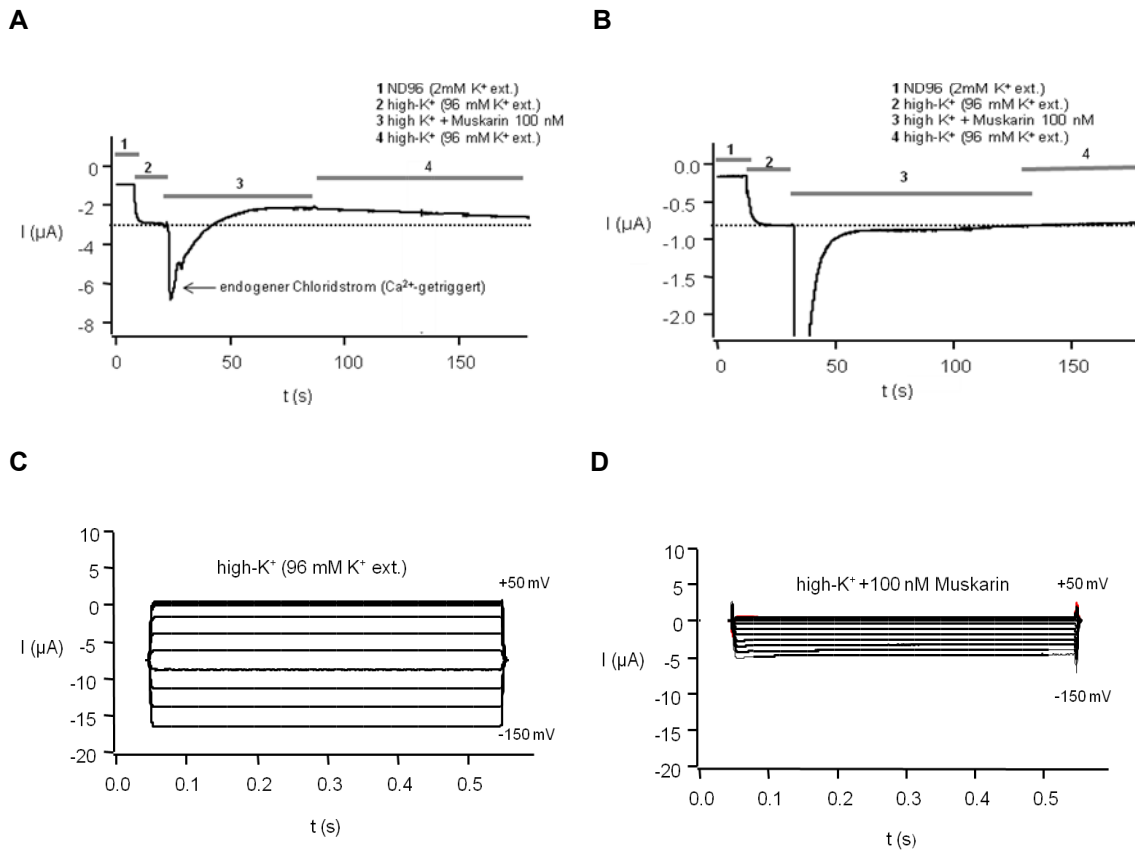
Für die Expression des Kanals mit dem Rezeptor wurden jeweils gleiche Mengen an cRNA in *Xenopus*-Oozyten injiziert und nach 72 h die exprimierten Ströme mittels „Zwei-Elektroden-Spannungsklemme“ gemessen.

Der Einwärtsstrom bei -70 mV Haltepotential betrug im Durchschnitt  $-99 \pm 155$  nA (n=33) in ND96 (2 mM K<sup>+</sup> ext.). Durch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf  $[K^+_{ext.}] = 96$  mM erreichte der Einwärtsstrom innerhalb von etwa einer Sekunde eine Amplitude von  $-1,59 \pm 0,93$   $\mu$ A (n=33).

Die Applikation von 100 nM Muskarin in der Hochkaliumlösung führte zunächst zu einer transienten Aktivierung eines zusätzlichen Einwärtsstromes. Diese Stromkomponente ist auf die intrazelluläre Calciummobilisierung der aktivierten G<sub>q</sub>-Proteine zurückzuführen, die hier einen endogen in den Oozyten vorhandenen Ca<sup>2+</sup>-aktivierten Chloridstrom aktivieren (Fuller et al., 2001).

Anschließend zeigte sich eine deutliche Abnahme des nicht-transienten, permanenten Einwärtsstroms, der auf die Inhibierung des Kir2.3-Stroms hindeutet. Diese Inaktivierung betrug nach 40 Sekunden Dauerapplikation von 100 nM Muskarin im Durchschnitt  $13,70 \pm 5,98$  % (n=6). Die Zeitkonstante  $\tau$  betrug  $60 \pm 35$  s. Der Vergleich der vor und nach der Rezeptoraktivierung gemessenen Stromwerte mittels t-Test nach Student ergab einen p-Wert von 0,002, was einem signifikanten Unterschied zwischen beiden Datenreihen entspricht. Nach Beenden der muskarinergen Stimulation war der inhibitorische Effekt in allen gemessenen Oozyten komplett reversibel.

Die Abbildung 7A zeigt exemplarisch den Kaliumstrom über Kir2.3 bei einem Haltepotential von -70 mV zunächst vor und im Verlauf nach Aktivierung des koexprimierten M1-Rezeptors mit 100 nM Muskarin. Zum Vergleich ist in Abbildung 7B der Strom über Kir2.2, ebenfalls nach Aktivierung des koexprimierten M1-Rezeptors dargestellt. Auch hier kommt es zunächst zu einem transienten,  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten, Chloridstrom. Die anschließend gemessene Stromstärke entspricht jedoch exakt wieder dem Ausgangswert vor der Rezeptoraktivierung, eine Inhibierung von Kir2.2 ist nicht nachweisbar. Abbildung 7C zeigt die Aktivierung des exprimierten Kir2.3-Stroms durch de- und hyperpolarisierende Spannungssprünge, ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV. Hyperpolarisationen bis auf -150 mV induzierten bei 96 mM extrazellulärem Kalium einen schnell aktivierenden, nicht transienten Einwärtsstrom. Die Applikation von 100 nM Muskarin (Abb. 7D) reduzierte die Stromamplitude, ohne die Kinetik des Einwärtsstroms zu verändern.



**Abb.7**

**A: Kir2.3 + M1-ACh-Rezeptor (Spannungsklemme -70 mV)**

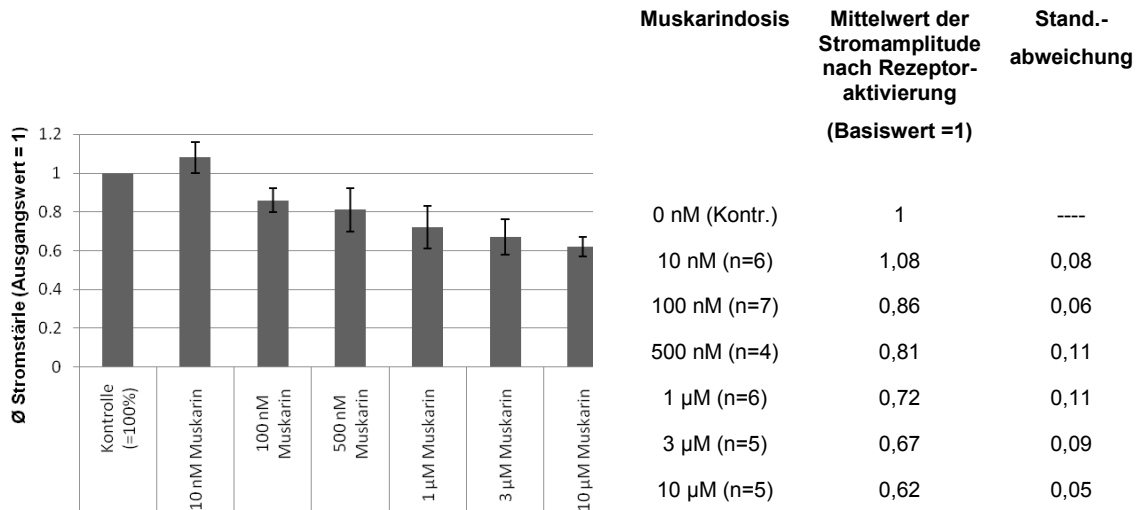
**B: Kir2.2 + M1-ACh-Rezeptor (Spannungsklemme -70 mV)**

**C: Kir2.3 + M1-ACh-Rezeptor (Spannungssprünge in „high-K<sup>+</sup>“)**

**D: Kir2.3 + M1-ACh-Rezeptor + 100 nM Muskarin (Spannungssprünge in „high-K<sup>+</sup>“)**

Um nachzuweisen, dass es sich bei der mit 100 nM Muskarin beobachteten Inhibierung von Kir2.3 tatsächlich um einen pharmakologischen Effekt handelt, der neben der Reversibilität des Effektes durch eine Dosisabhängigkeit gekennzeichnet ist, wurde in weiteren Oozyten (n=27) Kir2.3 mit dem M1-Acetylcholinrezeptor koexprimiert und der Rezeptor anschließend mit Muskarinkonzentrationen von 10 nM bis 10  $\mu$ M aktiviert. Abbildung 8 zeigt die zunehmende Reduktion der Stromstärke bei steigenden Muskarinkonzentrationen (Ausgangsstromstärke auf 1 normiert), wobei die maximale Inhibition bei 10  $\mu$ M Muskarin  $37,72 \pm 5,12$  % betrug.

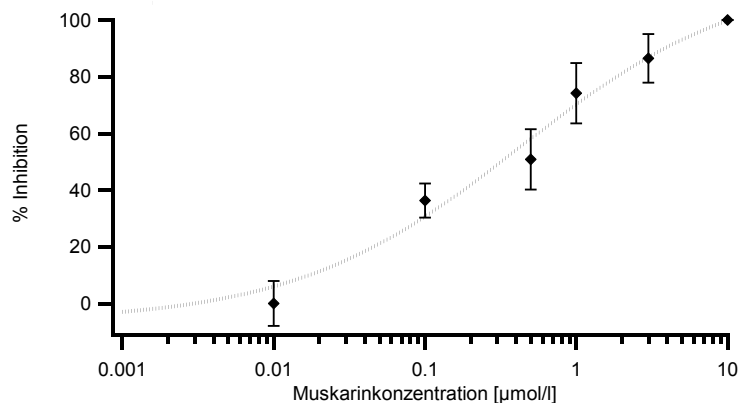




**Abb.8: Dosisabhängigkeit der Inhibition von Kir2.3 durch den M1-ACh-Rezeptor**

Die Aktivierung des Rezeptors mit 10 nM zeigte keine signifikante Beeinflussung der Stromamplitude ( $p=0,07$ ); alle anderen getesteten Konzentrationen zeigten eine signifikante Reduktion ( $p<0,05$ ).

Aus den gemessenen Daten lässt sich eine pharmakologische Dosis-Wirkungs-Kurve erstellen (Abb. 9). Hierzu wurde die bei Applikation von 10 µM Muskarin erreichbare Inhibition des Kir2.3-Stroms (37,7 %) als Maximalwert gleich 100 % gesetzt und die übrigen prozentualen Inhibitionswerte auf diesen Bezugswert normiert.



**Abb.9: Dosis-Wirkungs-Kurve der Inhibition von Kir2.3 durch den M1-ACh-Rezeptor**

Die errechnete mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ), d.h. die Konzentration, bei der 50 % der Maximalwirkung erreicht sind, betrug  $0,43 \pm 0,29 \mu\text{mol/l}$ . Die Steigung  $n_H$  (Hill-Koeffizient) betrug  $0,58 \pm 0,25$ . Daraus kann man schließen, dass keine Kooperativität vorliegt.

### **3.1.2 Koexpression von Kir2.1, 2.2 und 2.4 mit dem M1-Acetylcholinrezeptor**

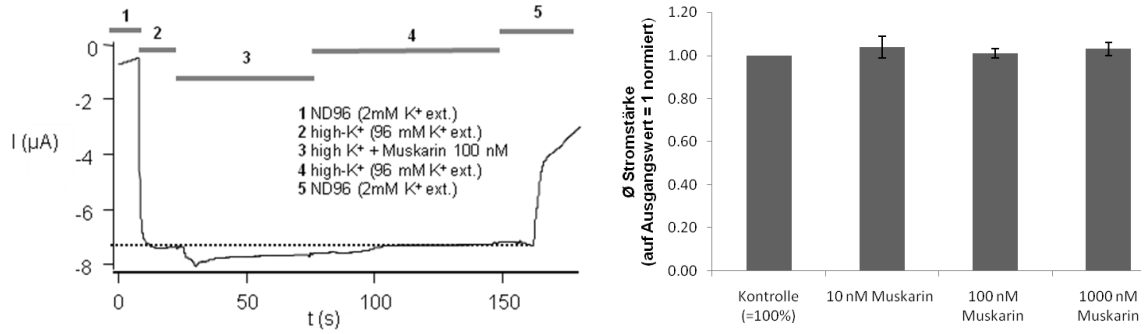
Um zu untersuchen, ob die Aktivierung des M1-Acetylcholinrezeptors auch Auswirkungen auf andere Kir2-Kanäle hat, wurde ebenfalls in *Xenopus*-Oozyten der M1-Acetylcholinrezeptor mit Kir2.1 ( $n=6$ ), Kir2.2 ( $n=4$ ) und Kir2.4 ( $n=5$ ) koexprimiert. Die Messung erfolgte wiederum nach einer Expressionsdauer von 72 h mithilfe der „Zwei-Elektroden-Spannungsklemme“.

Der Einwärtsstrom in ND96 (2 mM  $K^+$  ext.) betrug  $-195 \pm 336 \text{ nA}$  bei Kir2.1,  $-216 \pm 197 \text{ nA}$  bei Kir2.2 und  $-525 \pm 381 \text{ nA}$  bei Kir2.4. Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 96 mM vergrößerte den Einwärtsstrom auf  $-6,08 \pm 1,13 \mu\text{A}$  bei Kir2.1,  $-5,23 \pm 0,44 \mu\text{A}$  bei Kir 2.2 und  $-7,11 \pm 0,98 \mu\text{A}$  bei Kir2.4. Anschließend erfolgte die Stimulation des Rezeptors mit Muskarin in aufsteigender Dosierung mit 10 nM, 100 nM und 1.000 nM. Wie bei Kir2.3 konnte auch hier unmittelbar nach Aktivierung des Rezeptors ein zusätzlicher transientser Einwärtsstrom von etwa 20 Sekunden Dauer beobachtet werden. Die Applikation von 100 nM Muskarin veränderte anschließend die Stromamplitude bei Kir2.1 um  $+0,93 \pm 1,51 \%$ , bei Kir 2.2 um  $+1,54 \pm 4,13 \%$  und um  $+12,79 \pm 2,32 \%$  bei Kir 2.4. Die Erhöhung der applizierten Muskarindosis auf 1.000 nM Muskarin bewirkte eine Veränderung der Stromamplitude um  $+2,96 \pm 2,60 \%$  bei Kir2.1,  $-2,35 \pm 7,03 \%$  bei Kir2.2 und  $+11,70 \pm 4,45 \%$  bei Kir2.4 bezogen auf den Ausgangswert. Da die Zunahme der Stromamplitude bei Kir2.4 unabhängig von der Muskarindosis erfolgte und der Effekt durch Auswaschen des Muskarins nicht reversibel war, muss hier von einem rezeptorunabhängigen Effekt ausgegangen werden.

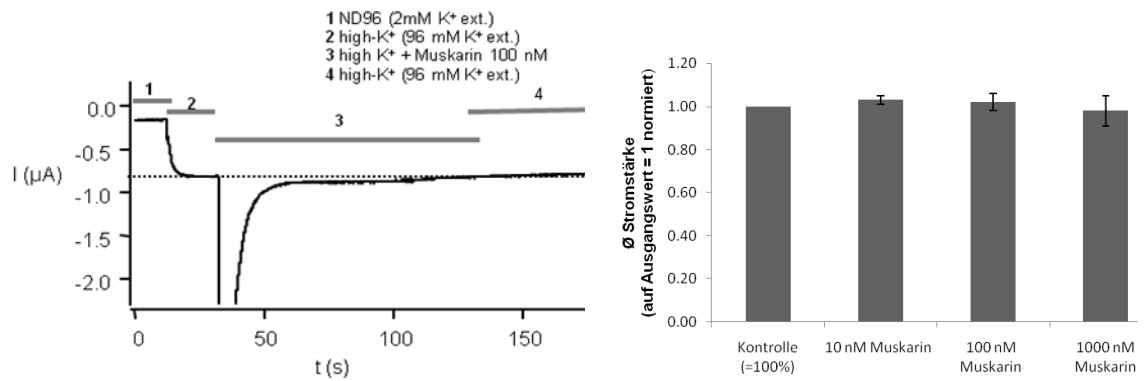
Zusammenfassend konnte bei Koexpression von Kir2.1, Kir2.2 und Kir2.4

jeweils mit dem M1-Acetylcholinrezeptor keine signifikante Inhibition eines Kanals nachgewiesen werden (Abb. 10).

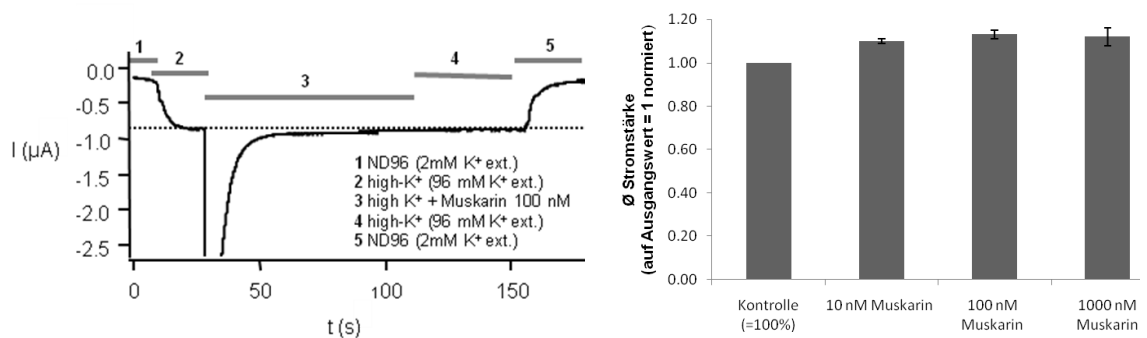
**A**



**B**



**C**



**Abb.10: Interaktion von Kir2.1 (A), Kir2.2 (B) und Kir2.4 (C) mit dem M1-Acetylcholinrezeptor (Spannungsklemme -70 mV)**

### 3.1.3 Koexpression von Kir2.1-Kir2.4 mit anderen G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren

Neben dem M1-Acetylcholinrezeptor existieren noch andere Rezeptoren, die denselben intrazellulären Signalweg wie der M1-Rezeptor in Gang setzen. Unter anderem sind dies der Serotoninrezeptor 5-HT<sub>2C</sub>, der Histaminrezeptor H1 und die Bradykininrezeptoren B1 und B2. Um zu untersuchen, ob diese Rezeptoren mit Kanälen der Kir2-Familie interagieren können, erfolgte ebenfalls die Expression dieser Rezeptoren mit jeweils einem der Kanäle Kir2.1-Kir2.4 in Xenopus-Oozyten und die Messung mittels „Zwei-Elektroden-Spannungsklemme“ nach Expressionszeiten zwischen 24 und 72 h. Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgte mit dem jeweils physiologischen Rezeptoragonisten (Serotonin in Konzentrationen zwischen 10 und 1000 nM, Histamin in Konzentrationen zwischen 10 und 1000 nM, Bradykinin in Konzentrationen zwischen 10 und 100 nM).

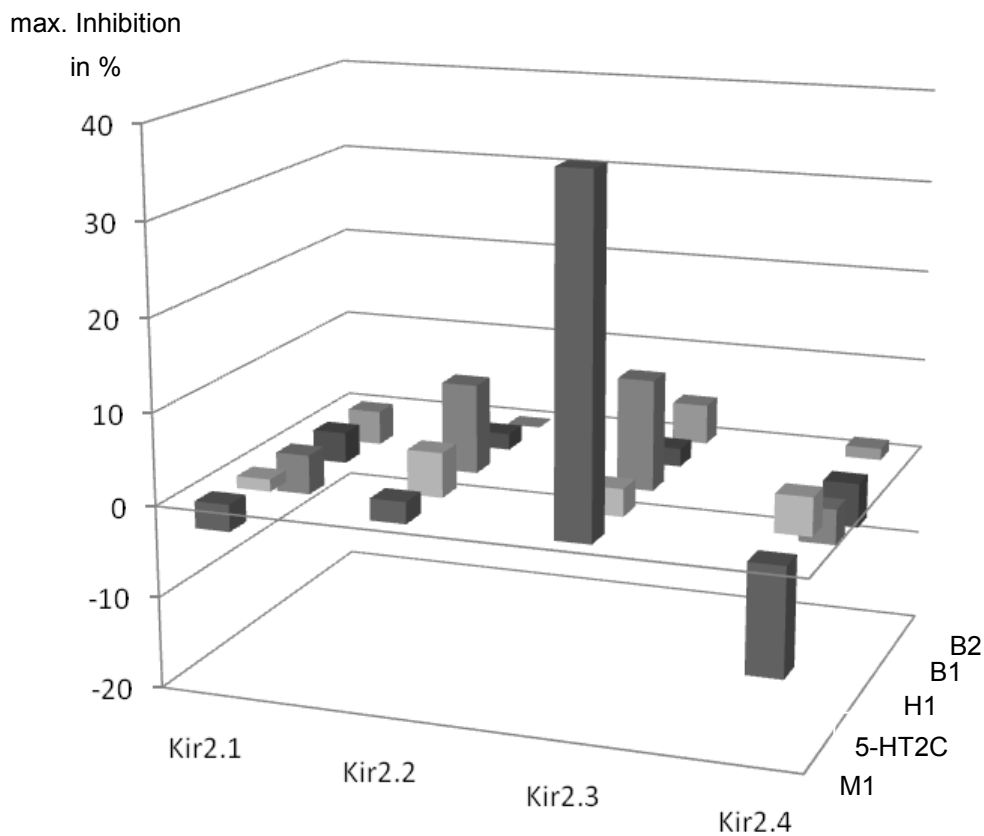
Wie folgende Tabelle (Tab. 6) zeigt, konnte für keine der untersuchten Kanal-Rezeptor-Kombinationen eine signifikante Inhibition des jeweiligen Kir-Stromes gezeigt werden. Scheinbar zeigte der Histaminrezeptor H1 eine inhibitorische Wirkung auf Kir2.2 und Kir2.3. Allerdings war dieser Effekt weder dosisabhängig noch durch Beenden der histaminergen Stimulation reversibel; vielmehr fand eine kontinuierliche Abnahme der Stromamplitude unabhängig von der Rezeptorstimulation statt.

untersuchter Kir-Kanal	koexprimierter Rezeptor	max. erreichbare Änderung der Stromstärke	Standardabw.
<b>Kir2.1</b>	5-HT <sub>2C</sub> (n=10)	+1,35 %	±0,39 %
	H1 (n=6)	+4,44 %	±13,29 %
	B1 (n=7)	+3,48 %	±2,72 %
	B2 (n=7)	+3,85 %	±5,96 %
<b>Kir2.2</b>	5-HT <sub>2C</sub> (n=5)	-4,86 %	±12,92 %
	H1 (n=5)	-9,72 %	±13,77 %
	B1 (n=5)	-1,76 %	±2,13 %
	B2 (n=5)	-0,02 %	±12,84 %

<b>Kir2.3</b>	5-HT <sub>2C</sub> (n=6)	-2,97 %	±4,76 %
	H1 (n=5)	-11,97 %	±1,36 %
	B1 (n=5)	-1,99 %	±3,98 %
	B2 (n=5)	-4,36 %	±8,84 %
<b>Kir2.4</b>	5-HT <sub>2C</sub> (n=5)	-4,14 %	±2,42 %
	H1 (n=5)	+3,85 %	±6,19 %
	B1 (n=5)	+4,86 %	±3,03 %
	B2 (n=5)	-1,27 %	±4,94 %

Tab.6

Abbildung 11 zeigt zusammenfassend den Einfluss aller untersuchten G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren auf die Kir-Kanäle Kir2.1 – Kir2.4.



**Abb.11: Übersicht über die Interaktion zwischen Kir2-Kanälen und G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren**

Eine Interaktion konnte ausschließlich zwischen Kir2.3 und dem M1-Acetylcholinrezeptor nachgewiesen werden. Kir2.1, 2.2 und 2.4 konnten durch

die Aktivierung des M1-Acetylcholinrezeptors nicht inhibiert werden.

Alle anderen getesteten G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren hatten keinen Einfluss auf die Kir-Kanäle Kir2.1-Kir2.4.

### 3.2 Mutation einer potentiellen Bindestelle in Kir2.3

Es stellte sich nun die Frage, warum die Aktivierung des M1-Acetylcholinrezeptors lediglich Auswirkungen auf Kir2.3, nicht aber auf die anderen Kanäle der Kir2-Familie zeigte.

Eine Sequenzanalyse der Kir2-Kanäle zeigte, dass Kir2.3 in der extrazellulären Schleife zwischen der Transmembrandomäne M1 und der Porenregion eine Aminosäuresequenz besitzt, die in den anderen Kir2-Kanälen nicht vorkommt (Abb. 12).

Da diese Aminosäuresequenz möglicherweise eine Bindungsstelle darstellt, über die die Inhibition des Kanals durch den M1-Acetylcholinrezeptor vermittelt werden könnte, wurde eine Kir2.3-Mutante hergestellt, bei der sechs Glycinreste durch Alanin ersetzt wurde. Der Aminosäureaustausch erfolgte elektroneutral, um die Tertiärstruktur des Kanals möglichst nicht zu verändern, da dies möglicherweise Einfluss auf die Leitfähigkeit des Kanals hätte nehmen können.

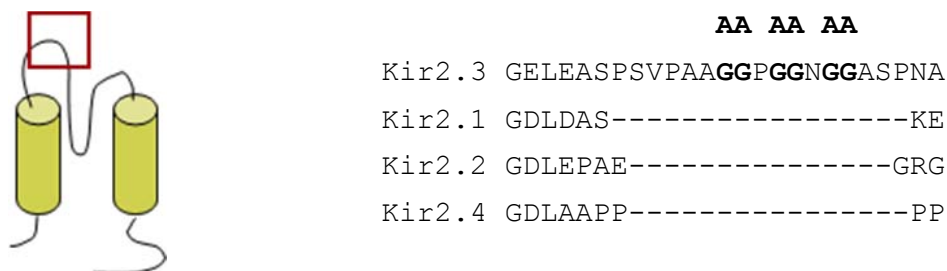
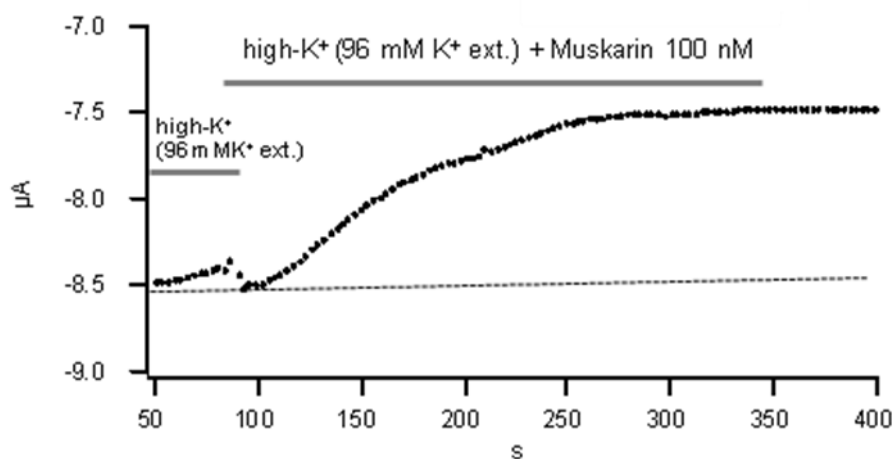


Abb.12: Sequenzvergleich von Kir2.1-Kir2.4 in der Extrazellulärregion und Austausch von sechs Glycinresten durch Alanin in Kir2.3

Nach der Koexpression der Mutante Kir2.3[AAA] mit dem M1-Acetylcholinrezeptor in Xenopus-Oozyten erfolgte nach einer Expressionsdauer von 72 h die elektrophysiologische Messung. In der Hochkaliumlösung (96 mM K<sup>+</sup> ext.) konnte ein Einwärtsstrom von 8,40  $\mu$ A gemessen werden. Nach Applikation von 100 nM Muskarin reduzierte sich der Einwärtsstrom auf 7,5  $\mu$ A, was einer Inhibition um 10,71 % entspricht (Abb. 13). Dieser Wert liegt im selben Bereich wie die Inhibition des nicht mutierten Kir2.3 durch 100 nM Muskarin (13,70  $\pm$  5,98 %). Somit konnte nicht nachgewiesen werden, dass die gezeigte unterschiedliche extrazelluläre Aminosäuresequenz für die muskarinerge Inhibition von Kir2.3 verantwortlich ist.



**Abb.13: Inhibition von Kir2.3[AAA] + M1-ACh-Rezeptor durch 100 nM Muskarin (Spannungsklemme -70 mV)**

## **4. Diskussion**

### **4.1 Intrazelluläre Signalwege der Kir2-Regulation**

Es gilt als erwiesen, dass - wie oben gezeigt - Kir2.3 über die Aktivierung des M1-Acetylcholinrezeptors inhibiert wird. Möglicherweise gilt dies auch für Kir2.1. Trotz aller Forschungen ist jedoch der intrazelluläre Signalweg, über den der M1-Acetylcholinrezeptor den Kanal inhibiert, noch nicht mit letztendlicher Sicherheit aufgeklärt. Dazu existieren unterschiedliche Thesen, die im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

#### **4.1.1 Kanalphosphorylierung durch PKC**

In mit dem Kir2.1-Kanal und dem M1-Acetylcholinrezeptor transfizierten tsA-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) konnte nach Aktivierung des Rezeptors mit dem M1-Agonisten Carbachol ein Rückgang des Kaliumstroms gezeigt werden (Jones, 1996). Diese Inhibition war nach Beenden der Rezeptorstimulation komplett reversibel, wohingegen der M1-Rezeptor-Antagonist Atropin eine Reduktion des Stroms verhinderte. Desweiteren wurde festgestellt, dass die Applikation von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), einem Aktivator der Proteinkinase C, einen ähnlichen Effekt wie die direkte Aktivierung des M1-Rezeptors bewirkte. Im Gegensatz dazu verhinderte die Applikation von Staurosporin, einem Inhibitor der Proteinkinase C, vor der Stimulierung des M1-Rezeptors mit Carbachol die sonst auftretende Inhibition. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass PKC an der Inhibition von Kir2.1 durch Phosphorylierung des Kanals beteiligt sein könnte, was durchaus einen Sinn ergibt, da zum einen PKC nachweislich in den Signalweg der G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren eingeschaltet ist, zum anderen auch bekannt ist, dass Kir-Kanäle durch Phosphorylierung beeinflusst werden können. Beispielsweise kann der Strom über Kir2.1 durch die direkte Phosphorylierung des Kanals durch eine Tyrosinkinase inhibiert werden (Wischmeyer et al., 1998).



Der inhibitorische Einfluss des M1-Acetylcholinrezeptors konnte auch für die Kir-Kanäle 2.2 und 2.3 gezeigt werden, der inhibitorische Effekt von PMA jedoch ausschließlich für Kir2.1 und nicht für Kir2.2 bzw. Kir2.3 (Rossignol & Jones, 2006).

In einem anderen Experiment konnten diese Beobachtungen jedoch nicht bestätigt werden (Chuang et al., 1997). Hier konnte eine Inhibition des Stroms nach Aktivierung des M1-Acetylcholinrezeptors durch Carbachol lediglich bei Kir2.3 beobachtet werden, nicht aber bei Kir2.1. Allerdings erfolgte die Expression des Rezeptors und der Kanäle in *Xenopus*-Oozyten und nicht in tsA-Zellen. Für den PKC-Aktivator PMA konnte ein inhibitorischer Effekt auf Kir2.3 gezeigt werden. Versuche mit dem inaktiven PMA-Isomer 4 $\alpha$ , das keine aktivierende Wirkung auf die Proteinkinase C besitzt, ergaben jedoch, dass die Applikation dieses Stoffes ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf Kir2.3 ausübte. Weiterhin konnte auch die Injektion eines Inhibitors der PKC (peptide inhibitor) die M1-vermittelte Inhibierung des Kir2.3-Stroms nicht verhindern. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass nicht ausschließlich die PKC eine Rolle bei der M1-vermittelten Hemmung des Kir2.3 spielt.

In der vorliegenden Arbeit konnte nach Koexpression des M1-Acetylcholinrezeptors und den Kaliumkanälen Kir2.1-Kir2.4 in *Xenopus*-Oozyten ebenfalls lediglich eine Inhibition des Kir2.3-Stroms gezeigt werden.

#### **4.1.2 Einfluss von Ca<sup>2+</sup>-Ionen**

Desweiteren wurde der mögliche Einfluss von Ca<sup>2+</sup>-Ionen auf die Leitfähigkeit von Kir2.3 untersucht. Ca<sup>2+</sup>-Ionen sind in den intrazellulären Signalweg der G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren eingebunden, da das im Verlauf der Signalweitergabe entstehende IP<sub>3</sub> für eine Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> sorgt. Experimentell konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Injektion von EGTA, einem Komplexbildner, der Ca<sup>2+</sup>-Ionen bindet, den typischen Ca<sup>2+</sup>-aktivierten

transienten  $\text{Cl}^-$ -Strom nach Aktivierung des Rezeptors unterbindet. Die Modulation des Kir2.3-Stroms durch den M1-Acetylcholinrezeptor konnte EGTA jedoch nicht verhindern (Chuang et al., 1997). Diese Daten legen nahe, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bei der Vermittlung der inhibierenden Wirkung auf Kir2.3 keine wesentliche Rolle spielen.

Auch die Injektion von weiteren im Signalweg der  $G_q$ -gekoppelten Rezeptoren beteiligten Molekülen, wie z.B. DAG,  $\text{IP}_3$  oder PLC, zeigte keine signifikante Inhibition des Kir2.3-Stroms (Chuang et al., 1997).

#### **4.1.3 Einfluss von $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen**

Auf der Suche nach einem ‚neuen, diffusiblen second-messenger‘ wurde festgestellt, dass der Strom über Kir2.3-Kanäle anstieg, wenn EDTA in die Zelle injiziert wurde, nicht jedoch nach Injektion von EGTA (Chuang et al., 1997).

Da ein grundlegender Unterschied zwischen EGTA und EDTA darin liegt, dass EDTA in der Lage ist, zusätzlich neben  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auch  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen zu binden, lag es nahe zu vermuten, dass  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen einen inhibitorischen Effekt auf Kir2.3 haben könnten.

Dass  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen eine wesentliche Rolle beim Vorgang der Einwärtsgleichrichtung durch Blockierung der Kanalpore spielen, ist bewiesen; als Bindungsstelle für  $\text{Mg}^{2+}$  konnte beispielsweise bei Kir2.1 eine einzelne negativ geladene Aminosäure an Position 224 in der C-terminalen Region (E224) von Kir2.1 identifiziert werden (Tagliatela et al., 1995).

Ungeklärt ist allerdings bislang, wie  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen in den Signalweg der  $G_q$ -gekoppelten Rezeptoren eingebunden sein könnten.

#### 4.1.4 Einfluss der GTPase Rho

Experimente mit der sogenannten kleinen GTPase Rho zeigten, dass die Cotransfektion von Kir2.1 - Kir2.3, dem M1-Acetylcholinrezeptor und einer aktivierten Mutante der GTPase Rho in tsA-Zellen nach Rezeptoraktivierung die Stromstärke reduzierte, wohingegen die Applikation von Coenzym C3, einem selektiven Inhibitor der GTPase Rho, die M1-vermittelte Inhibition von Kir2.1 - 2.3 verhinderte (Rossignol & Jones, 2006). Es wurde vermutet, dass möglicherweise eine calciumabhängige Aktivierung der GTPase Rho die kanalinhäbitorische Wirkung nach Rezeptorstimulation vermitteln könnte.

#### 4.1.5 Regulation durch PIP<sub>2</sub>

Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP<sub>2</sub>) ist eine Substanz, die ebenfalls in den Signalweg der G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren eingeschaltet ist und in der Lage ist, membranassoziierte Proteine zu regulieren (Klinke, Pape, Silbernagl, 2005). Cho et al. (2005) zeigten, dass PIP<sub>2</sub> auch eine Rolle bei der Regulation einwärtsgerichteter Kanäle spielt, allerdings kanalspezifisch unterschiedlich. Bei den Kanälen der Kir3-Familie, die einerseits durch Rezeptoren der G<sub>i/o</sub>-Klasse aktiviert, andererseits durch Rezeptoren der G<sub>q</sub>-Klasse inhibiert werden können (Karschin, 1999), verstärkte die Applikation von Wortmannin, einem Phosphatidylinositolkinase-Inhibitor, der die Neubildung von PIP<sub>2</sub> verhindert, die G<sub>q</sub>-vermittelte Inhibition der Kanäle und machte diese irreversibel. Bei den Kir2-Kanälen war die Applikation von Wortmannin Voraussetzung für das Beobachten einer G<sub>q</sub>-Rezeptor-vermittelten Inhibition (Cho et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte diese Beobachtung nicht bestätigt werden, da hier eine Inhibition von Kir2.3 nach Aktivierung des M1-ACh-Rezeptors auch ohne Applikation von Wortmannin gezeigt werden konnte.

Da auch Bindungsstellen für PIP<sub>2</sub>, mehrere positiv geladene Aminosäurereste (Arginin, Lysin) in der N- bzw. C-terminalen Region der Kir-Kanäle,

nachgewiesen werden konnten (Zhang et al., 1999), ist es wahrscheinlich, dass  $\text{PIP}_2$  an der  $G_q$ -vermittelten Inhibition von Kir2.3 beteiligt ist. Es wird angenommen, dass die Ankopplung von  $\text{PIP}_2$  an Kir-Kanäle Voraussetzung für deren Leitfähigkeit ist und eine Verminderung des gebundenen  $\text{PIP}_2$  ( $\text{PIP}_2$ -Depletion) die Leitfähigkeit reduziert. Die Affinität des Kanals zu  $\text{PIP}_2$  soll über unterschiedliche Signalwege, beispielsweise Phosphorylierung durch PKC oder direkte Interaktion mit  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten, moduliert werden (Xie et al., 2008).

## 4.2 Rezeptor- und Kanalspezifität der Inhibition von Kir2

In den Versuchen zu dieser Arbeit fiel neben der Kanalspezifität der Inhibition, d.h. die Tatsache, dass in unseren Versuchen lediglich Kir2.3 durch  $G_q$ -gekoppelte Rezeptoren beeinflusst wird, besonders die Rezeptorspezifität der Inhibition auf.

Ein Sequenzvergleich der Kanäle Kir2.1-Kir2.4 zeigte eine abweichende Aminosäuresequenz in einer extrazellulären Region von Kir2.3; eine Mutation der auffälligen Sequenz zeigte jedoch keinen Unterschied der kanalspezifischen Inhibition von Kir2.3 durch den M1-Acetylcholinrezeptor.

Eventuell kann die Kanalspezifität der Inhibition durch die unterschiedliche Affinität von  $\text{PIP}_2$  zu den verschiedenen Kanälen der Kir2-Unterfamilie erklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede in der Dissoziationsgeschwindigkeit von  $\text{PIP}_2$  von verschiedenen Kir-Kanälen gibt. So erfolgt beispielsweise die Dissoziation von Kanälen der Kir3-Familie weitaus schneller als von Kanälen der Kir2-Familie (Huang et al., 1998).

Insofern ist es vorstellbar, dass die Affinität von  $\text{PIP}_2$  zu Kir2.1, Kir2.2 und Kir2.4 möglicherweise höher ist als die zu Kir2.3. Die intrazelluläre  $\text{PIP}_2$ -Depletion durch die Aktivierung des M1-ACh-Rezeptors bewirkt dann vorrangig die Abtrennung von  $\text{PIP}_2$  von Kir2.3, wodurch die Leitfähigkeit des Kanals reduziert wird.

Die unterschiedliche PIP<sub>2</sub>-Affinität erklärt aber nicht das rezeptorspezifisch unterschiedliche Verhalten, das heißt, warum in unseren Versuchen nur der M1-Acetylcholinrezeptor eine inhibitorischer Wirkung auf Kir2-Kanäle zeigte, nicht aber die anderen getesteten G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren. Dies ist insofern verwunderlich, weil nach derzeit herrschender Meinung alle G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren denselben, in der Einleitung beschriebenen, intrazellulären Signalweg in Gang setzen. Eventuell hängt dies mit einer etwas komplexeren intrazellulären Zellstruktur zusammen. Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb einer Zelle viele verschiedene Kompartimente existieren, in denen die verschiedenen chemischen Reaktionen unter unterschiedlichen Rahmenbedingungen ablaufen können (Kleinig et al, 1999). Deshalb kann man nicht unbedingt davon ausgehen, dass jeder G<sub>q</sub>-gekoppelte Rezeptor auch mit jedem Kanal Kontakt aufnehmen kann. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass bestimmte Rezeptoren von vornherein mit bestimmten Kanälen assoziiert sind und aufgrund der räumlichen Zusammenlagerung nur mit diesen interagieren können.

### **4.3 Ausschluss einer Rezeptorinternalisierung**

Bei den Experimenten zu dieser Arbeit fiel auf, dass die Auswaschdauer, das heißt die Zeit, die vergeht, bis sich der inhibitorische Effekt durch den M1-Acetylcholinrezeptor nach Beenden der Rezeptorstimulation vollständig zurückgebildet hat, bei Kir2.3 durchschnittlich im Bereich von mehreren Minuten liegt, was einer im Vergleich zu anderen rezeptorinduzierten Effekten relativ langen Zeit entspricht. Es musste daher in Betracht gezogen werden, ob der inhibitorische Effekt vielleicht auf eine Internalisierung des Kir2.3-Kanals zurückzuführen sein könnte, das heißt ein Ausbau der Kanals aus der Zellmembran und Transport in das Innere der Zelle, vermittelt durch bestimmte Transportproteine, wie zum Beispiel Clathrin, das bei der rezeptorabhängigen Endozytose eine Rolle spielt (Morris et al., 1989).

Diese Möglichkeit wurde am Physiologischen Institut der Universität Würzburg durch Dr. Georg Polleichtner (jetzt Universität Aachen) mittels eines

Oberflächen-Lumineszenz-Testes untersucht. Dazu wurde der an einen HA-TAG gekoppelte Kir2.3 zusammen mit dem M1-Acetylcholinrezeptor in Oozyten koexprimiert und mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Anti-HA-Antikörpers die Fluoreszenz vor und nach Aktivierung des M1-Acetylcholinrezeptors gemessen. Zu jedem Zeitpunkt war die Fluoreszenz nach Aktivierung des Rezeptors größer als vor Aktivierung. Es konnte somit keine signifikante Abnahme der Fluoreszenz gezeigt werden, so dass die These, eine Internalisierung des Kir2.3-Kanals könnte für den inhibitorischen Effekt des M1-Acetylcholinrezeptors verantwortlich sein, mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

#### **4.4 Verteilung und Funktion von Kir-Kanälen im Säugerhirn**

Es konnte gezeigt werden, dass die Mitglieder der Kir2-Familie unterschiedlich im Gehirn verteilt sind (Karschin et al., 1996).

Kir2.1 ist in der Ratte besonders im olfaktorischen System, im Neokortex, im Hippocampus, den Basalganglien und dem Mittelhirn exprimiert. Kir2.2 zeigt eine beinahe ubiquitäre Verteilung im Gehirn, wobei der Thalamus und der Hirnstamm die Orte der stärksten Expression darstellen. Kir2.3 ist im Hirnstamm und dem Kleinhirn nicht nachweisbar, zeigt aber eine starke Expression in Bereichen des Thalamus (Nucleus reticularis) und der Basalganglien, Hippocampus, Neocortex sowie ebenfalls dem olfaktorischen System. Für Kir2.4 konnte eine Assoziation mit den Motoneuronen von Hirnnervenkernen gezeigt werden (Töpert et al., 1998).

Interessanterweise ist die Verteilung der M1-Acetylcholinrezeptoren eng mit der Verteilung von Kir2.3 assoziiert. M1-Rezeptoren sind am dichtesten in Neocortex, Hippocampus und Neostriatum exprimiert (Abrams et al., 2006).

Der Neocortex ist der phylogenetisch jüngste Teil der Großhirnrinde bei Säugetieren. Er umfasst unter anderem die sensorischen Areale sowie den

Motorcortex.

Der Hippocampus zählt zu den evolutionär ältesten Strukturen des Gehirns und ist Bestandteil des limbischen Systems. Dieses ist unter anderem an der Verarbeitung von Emotionen und der Entstehung von Triebverhalten beteiligt. Einige häufige psychiatrische Erkrankungen, wie z.B. Angsterkrankungen, Depressionen oder Schizophrenien, sind wahrscheinlich auf eine Dysfunktion des limbischen Systems zurückzuführen (Klinke, Pape, Silbernagl, 2005). Möglicherweise liegen diesen Krankheiten unter anderem auch Fehlfunktionen von Kir-Kanälen zugrunde.

Das Neostriatum ist Bestandteil der Basalganglien, welche wichtig für die Durchführung komplexer Bewegungen sind. Die typische Symptomentrias der Parkinsonschen Erkrankung, Akinese, Rigor und Tremor, beruht auf einem Mangel dopaminerger Neurone in den Basalganglien bei gleichzeitigem relativen Überwiegen des cholinergen Systems (Poeck et al., 2001)

Shen et al. (2007) konnten zeigen, dass die muskarinerge Inhibition von Kir2-Kanälen die Erregbarkeit von Neuronen des Striatopallidums erhöht. Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus für synaptische Umbauvorgänge verantwortlich ist, wie sie beispielsweise durch einen Verlust dopaminerger Neurone im Striatum ausgelöst werden.

#### **4.5 Mögliche Funktion von Kir-Kanälen im Herz**

Im Säugerherz sind Kir2-Kanäle hauptsächlich im Ventrikel exprimiert und dort an der Bildung des  $I_{K1}$ -Stroms beteiligt, der für die Stabilisierung des Ruhemembranpotentials und für die Repolarisation während eines Aktionspotentials sorgt. Grundlage des  $I_{K1}$ -Stroms sind nicht nur Kanäle der Kir2.1-Unterfamilie sondern auch Kir2.3-Kanäle (He et al., 2008).

Muskarinerge Rezeptoren sind ebenfalls im Herz exprimiert. Neben den Muskarinrezeptoren der Klasse M2 hauptsächlich im Atrium, konnten

inzwischen auch Muskarinrezeptoren der Klassen M1, M3 und M5 sowohl im Atrium als auch im Ventrikel nachgewiesen werden (Wang et al., 2001).

Die muskarinerge, parasymphatische Innervation des Herzens erfolgt über den Nervus vagus; diese führt zu einer Verlangsamung des Pulses (negative Chronotropie), einer Herabsetzung der Erregbarkeit (negative Bathmotropie) sowie zu einer Verlangsamung der atrioventrikulären Überleitung (negative Dromotropie). Vermittelt werden diese Wirkungen über atriale M2-Acetylcholinrezeptoren. Die Aktivierung dieser  $G_i$ -gekoppelten Rezeptoren bewirkt am Sinus- bzw. AV-Knoten die Öffnung bestimmter Kaliumkanäle ( $IK_{ACh}$ ), was zur Hyperpolarisation des Membranpotentials und zu einer erschwerten Auslösung eines Aktionspotentials führt (Klinke, Pape, Silbernagl, 2005). Während allgemein davon ausgegangen wird, dass die parasymphatische Innervation hauptsächlich auf das Atrium beschränkt sei (Speckmann et al., 2008), gibt es einige Hinweise, dass es durchaus eine funktionell bedeutende vagale Innervation der Ventrikel geben könnte (Lewis et al., 2001; Brack et al., 2009). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass in vivo die Kontraktilität des linken Ventrikels durch Vagusstimulation abnimmt.

Insgesamt sind also die funktionellen Voraussetzungen für eine Interaktion von M1-Acetylcholinrezeptoren und Kir2.3 am Herz gegeben. Eine Inhibition der Kir2.3-Kanäle würde das Membranpotential der ventrikulären Kardiomyozyten depolarisieren und so – wie am Gehirn gezeigt – die Erregbarkeit der Zellen erhöhen, was eigentlich dem Gegenteil der normalen parasymphatischen Wirkung entspricht. Möglicherweise ist dies ein Schutzmechanismus, der bei überschießender parasymphatischer Stimulation des Herzens die Aufrechterhaltung des Herzschlages und damit des Kreislaufes sichert. Es ist geplant, im Anschluss an diese Arbeit die Interaktion von M1-Rezeptoren und Kir2.3 an murinen Ventrikelmyozyten genauer zu untersuchen.



## 5. Zusammenfassung

Einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (Kir), aktuell in die 7 Unterfamilien Kir1-Kir7 eingeteilt, sind an der Regulation einer Vielzahl von Körperfunktionen, beispielsweise Herzfrequenz, Erregbarkeit von Nervenzellen, Tonus von Gefäßmuskelzellen, Hormonsekretion oder Aktivierung von Immunzellen, beteiligt. Für die Kontrolle dieser Funktionen ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Leitfähigkeit dieser Kanäle beeinflusst werden kann. Die Kir3-Unterfamilie (früher GIRK für G-protein-activated-K<sup>+</sup>-channels) wird beispielsweise obligat durch die direkte Bindung der  $\beta\gamma$ -Untereinheit des trimeren G<sub>i/o</sub>-Proteins aktiviert (Karschin, 1999). Es gibt Hinweise in der Literatur, dass auch die stark einwärts gerichteten Kanäle der Kir2-Familie durch G-Proteine der G<sub>q</sub>-Familie reguliert sein können. Dabei widersprechen sich insbesondere zwei Untersuchungen zur Spezifität der Interaktion (Jones, 1996; Chuang et al., 1997). Ebenso ist der intrazelluläre Signalweg bislang nicht hinreichend geklärt.

Um dies genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die Kir-Kanäle Kir2.1-Kir2.4 jeweils mit 5 verschiedenen G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren in *Xenopus*-Oozyten koexprimiert und mit der Technik der „Zwei-Elektroden-Spannungsklemme“ der Strom über die Kir-Kanäle vor und nach Rezeptoraktivierung mit dem jeweils physiologischen Rezeptoragonisten gemessen. Es zeigte sich, dass ausschließlich Kir2.3 nach Aktivierung des M1-Acetylcholinrezeptors inhibiert wird. Eine Sequenzanalyse zeigte in der Extrazellulärregion von Kir2.3 eine zu den anderen Kir2-Kanälen abweichende Aminosäuresequenz, welche durch Mutation aber als potentielle Bindestelle zur Vermittlung des inhibitorischen Effektes ausgeschlossen werden konnte.

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass die Koexpression von Kir2.3 und M1-Acetylcholinrezeptor in bestimmten Gehirnregionen der Kontrolle neuronaler Erregbarkeit dient (Shen et al., 2007), ist es wahrscheinlich, dass derselbe Mechanismus auch in ventrikulären Kardiomyozyten existiert und dort als Schutzmechanismus vor vagaler Überstimulation fungiert.

## 6. Literaturverzeichnis

**Abraham M.R., Jahangir A., Alekseev A.E., Terzic A.** (1999) Channelopathies of inwardly rectifying potassium channels. *FASEB J.* **13** (14): 1901-1910.

**Abrams P., Andersson K.-E., Buccafusco J.J., Chapple C., Chet de Groat W., Fryer A.D., Kay G., Laties A., Nathanson N.M., Pasricha P.J., Wein A.J.** (2006) Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br. J. Pharmacol.* **148** (5): 565-578.

**Brack K.E., Patel V.H., Mantravardi R., Coote J.H., Ng G.A.** (2009) Direct evidence of nitric oxide release from neuronal nitric oxide synthase activation in the left ventricle as a result of cervical vagus nerve stimulation. *J. Physiol.* **587** (Pt. 12): 3045-3054.

**Cho H., Lee D., Lee S.H., Ho W.-K.** (2005) Receptor-induced depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibits inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in a receptor-specific manner. *PNAS* **102** (12): 4643-4648.

**Chuang H., Jan Y.N., Jan L.Y.** (1997) Regulation of IRK3 inward rectifier K<sup>+</sup> channel by m1 acetylcholine receptor and intracellular magnesium. *Cell* **89** (7): 1121-1132.

**Derst C., Karschin A.** (1998) Evolutionary link between prokaryotic and eukaryotic K<sup>+</sup> channels. *J. Exp. Biol.* **201** (Pt 20): 2791–2799.

**Doyle D.A., Cabral J.M., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R.** (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280** (5360): 69-77.

**Ficker E., Taglialatela M., Wible B.A., Henley C.M., Brown A.M.** (1994) Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Science* **266** (5187): 1068-1072.

**Fournet J.C., Junien C.** (2004) Genetics of congenital hyperinsulinism. *Endocr. Pathol.* **15** (3): 233-240.

**Fuller C.M., Ji H.L., Tousson A., Elble R.C., Pauli B.U., Benos D.J.** (2001) Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels: a newly emerging anion transport family. *Pflügers Arch.* **443** Suppl 1: 107-110.

**Hassinen M., Paajanen V., Vornanen M.** (2008) A novel inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel, Kir2.5, is upregulated under chronic cold stress in fish cardiac myocytes. *J. Exp. Biol.* **211**(Pt 13): 2162-2171.

**He Y., Pan Q., Li J., Chen H., Zhou Q., Hong K., Brugada R., Perez G.J. Brugada P., Chen Y.-H.** (2008) Kir2.3 knock-down decreases I<sub>K1</sub> current in neonatal rat cardiomyocytes. *FEBS Lett.* **582** (15): 2338-2342.

**Hille B.** (1992) Ion channels of excitable membranes (second edition). *Sinauer Associates Inc.*, Sunderland, Massachusetts.

**Huang C.L., Feng S., Hilgemann D.W.** (1998) Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP<sub>2</sub> and its stabilization by Gβγ. *Nature* **391** (6669): 803-806.

**Isomoto S., Kondo C., Kurachi Y.** (1997) Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function. *Jpn J Physiol.* **47** (1): 11-39.

**Jenkinson D.H.** (2006) Potassium channels - multiplicity and challenges *Br. J. Pharmacol.* **147** Suppl. 1: 63-71.

**Jones S.V.P.** (1996) Modulation of the inwardly rectifying potassium channel IRK1 by the m1 muscarinic receptor. *Mol. Pharmacol.* **49** (4): 662-667.

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

**Karschin A.** (1999) G Protein regulation of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *News Physiol. Sci.* **14**: 215-220.

**Karschin C., Dißmann E., Stühmer W., Karschin A.** (1996) IRK (1-3) and GIRK (1-4) inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J. Neurosci.* **16** (11): 3559-3570.

**Kleinig H., Sitte P.** (1999) Zellbiologie (4. Aufl.). *Gustav Fischer Verlag*, Jena.

**Klinke R., Pape H.-C., Silbernagl S.** (2005) Physiologie (5.Aufl.). *Thieme-Verlag*, Stuttgart.

**Lewis M.E., Al-Khalidi A.H., Bonser R.S., Clutton-Brock T., Morton D., Paterson D., Townend J.N., Coote J.H.** (2001) Vagus nerve stimulation decreases left ventricular contractility in vivo in the human and pig heart. *J. Physiol.* **534** (Pt. 2): 547-552.

**Mark M.D, Herlitze S.** (2000) G-protein mediated gating of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Eur. J. Biochem.* **267**(19): 5830-5836.

**Montell C.** (2005) The TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE* **2005** (272): re3.

**Morris S.A., Ahle S., Ungewickell E.** (1989) Clathrin-coated vesicles. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1** (4): 684-690.

**Nakamura T.Y., Artman M., Rudy B., Coetzee W.A.** (1998) Inhibition of rat ventricular IK1 with antisense oligonucleotides targeted to Kir2.1 mRNA. *Am. J. Physiol.* **274** (3 Pt 2): 892-900.

**Poeck K., Hacke W.** (2001) Neurologie (11. Aufl.). *Springer-Verlag*, Berlin.

**Reimann F., Ashcroft F.M.** (1999) Inwardly rectifying potassium channels. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11** (4): 503-508.

**Rossignol T.M., Jones S.V.P.** (2006) Regulation of a family of inwardly rectifying potassium channels (Kir2) by the m1 muscarinic receptor and the small GTPase Rho. *Pflügers Arch.* **452** (2): 164-174.

**Sakura H., Ammälä C., Smith P.A., Gribble F.M., Ashcroft F.M.** (1995) Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic beta-cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett.* **377** (3): 338-344.

**Shen W., Tian X., Day M., Ulrich S., Tkatch T., Nathanson N.M., Surmeier D.J.** (2007) Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat. Neurosci.* **10** (11): 1458-1466.

**Shuck M.E., Piser T.M., Bock J.H., Slightom J.L., Lee K.S., Bienkowski M.J.** (1997) Cloning and characterization of two K<sup>+</sup> inward rectifier (Kir) 1.1 potassium channel homologs from human kidney (Kir1.2 and Kir1.3). *J. Biol. Chem.* **272** (1): 586-593.

**Speckmann E.-J., Hescheler J., Köhling R.** (2008) *Physiologie* (5. Aufl.). Elsevier-Verlag, München.

**Stonehouse A.H., Pringle J.H., Norman R.I., Stanfield P.R., Conley E.C., Brammar W.J.** (1999) Characterisation of Kir2.0 proteins in the rat cerebellum and hippocampus by polyclonal antibodies. *Histochem. Cell. Biol.* **112** (6): 457-465.

**Tagliatela M., Ficker E., Wible B.A., Brown A.M.** (1995) C-terminus determinants for Mg<sup>2+</sup> and polyamine block of the inward rectifier K<sup>+</sup> channel IRK1. *EMBO J.* **14** (22): 5532-5541.

**Töpert C., Döring F., Wischmeyer E., Karschin C., Brockhaus J., Ballanyi K., Derst C., Karschin A.** (1998) Kir2.4: A novel K<sup>+</sup> inward rectifier channel associated with motoneurons of cranial nerve nuclei. *J. Neurosci.* **18** (11): 4096-4105.

**Tristani-Firouzi M., Jensen J.L., Donaldson M.R., Sansone V., Meola G., Hahn A., Bendahhou S., Kwiecinski H., Fidzianska A., Plaster N., Fu Y.H., Ptacek L.J., Tawil R.** (2002) Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J. Clin. Invest.* **110** (3): 381-388.

**Wang H., Han H., Zhang L., Shi H., Schram G., Nattel S., Wang Z.** (2001) Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart. *Mol. Pharmacol.* **59** (5): 1029-1036.

**Wickman K., Pu W.T., Clapham D.E.** (2002) Structural characterization of the mouse GIRK genes. *Gene* **284** (1-2): 241-250.

**Wischmeyer E., Döring F., Karschin A.** (1998) Acute suppression of inwardly rectifying Kir2.1. channels by direct tyrosine kinase phosphorylation. *J. Biol.Chem.* **273** (51): 34063-34068.

**Wischmeyer E., Lentjes K.U., Karschin A.** (1995) Physiological and molecular characterization of an IRK-type inward rectifier K<sup>+</sup> channel in a tumour mast cell line. *Pflügers Arch.* **429** (6): 809-819.

**Xie L.H., John S.A., Ribalet B., Weiss J.N.** (2008) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) regulation of strong inward rectifier Kir2.1 channels: multilevel positive cooperativity. *J. Physiol.* **586** (7): 1833-1848.

**Zhang H., He C., Yan X., Mirshahi T., Logothetis D.E.** (1999) Activation of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by distinct PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> interactions. *Nat. Cell Biol.* **1** (3): 183-188.



# Lebenslauf

## Angaben zur Person

**Name:** Lorenz Fuchs  
**Wohnort:** Rottendorfer Str. 29b  
97074 Würzburg  
**geb. am:** 12.07.1982  
**Familienstand:** Ledig  
**Nationalität:** Deutsch

## Schullaufbahn

**1988 - 1992** Grundschule Alzenau  
**1992 - 2001** Spessart-Gymnasium Alzenau  
**06/2001** Abitur

## Zivildienst

**07/2001 - 04/2002** Pflegehelfer im BRK-Seniorenheim Alzenau

## Studium

**10/2002 - 06/2009** Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg  
**09/2004** Ärztliche Vorprüfung  
**02/2008 - 06/2008** 1. Tertial des Praktischen Jahres an der Klinik für Kinder und Jugendliche des Klinikums Coburg  
**06/2008 - 10/2008** 2. Tertial des Praktischen Jahres an der I./II. Med. Klinik des Klinikums Coburg  
**10/2008 - 01/2009** 3. Tertial des Praktischen Jahres an der I./II. Chirurgischen Klinik des Klinikums Coburg  
**04/2009** Schriftlicher Teil des 2. Abschnittes der Ärztlichen Prüfung  
**06/2009** Mündlicher Teil des 2. Abschnittes der Ärztlichen Prüfung

## Beruf

**seit 07/2009** Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Würzburg

Würzburg, August 2009