

**Untersuchungen zu Struktur und Funktion Ca²⁺-aktivierter
Kaliumkanäle und ihrer Verwendung im Hochdurchsatz-
Screening**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim

Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von Apothekerin Sabine Roth
aus Büdingen,
Frankfurt 2006

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Starke

Gutachter:

1. Prof. Dr. T. Dingermann
2. Prof. Dr. A. Busch

Datum der Disputation: 06.02.2006

Für Wilma Roth

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Bluthochdruck und seine medikamentöse Behandlung	1
1.2 Physiologie der Gefäßwand	3
1.3 Regulation des Membranpotentials in glatten Muskelzellen durch Kaliumkanäle	7
1.4 Der MaxiK Kanal	9
1.5 Der MaxiK Kanal als Zielstruktur für die Entwicklung neuer Antihypertensiva	14
1.6 Fragestellung	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Molekularbiologische Methoden	18
2.1.1 Genetische Transformation von <i>E. coli</i>	18
2.1.2 Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren	19
2.1.2.1 Präparative Plasmid-DNS-Isolierung aus <i>E. coli</i> -LB-Medien	19
2.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren	19
2.1.3.1 DNS-Agarose-Gelelektrophorese	19
2.1.3.2 Denaturierende RNS-Agarose-Gelelektrophorese	20
2.1.4 Detektion und Identifizierung von Nucleinsäuren	20
2.1.4.1 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	20
2.1.4.2 Sequenzierung	21
2.1.5 Modifikation von Nucleinsäuren	21
2.1.5.1 Spaltung von DNS mit DNS-Restriktionsendonukleasen	21
2.1.5.2 Ligation von DNS	21
2.1.5.3 cRNS-Synthese	21
2.1.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	22
2.1.6.1 Analytische PCR-Amplifikation	22
2.1.6.2 Präparative PCR-Amplifikation	23
2.1.7 Oligodesoxynucleotide	24
2.1.8 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	25
2.2 Kultivierung von Säugetierzellen	25
2.2.1 Verwendete Säugetierzelllinien	25
2.2.2 Expressionsregulierte Zelllinien: Das TRex-System	26
2.2.3 Primärkulturen	28
2.2.4 Auftauen der Zellen	28
2.2.5 Mediumwechsel	28
2.2.6 Zellpassagierung	28
2.2.7 Bestimmung der Zellzahl	29
2.2.8 Ausplattieren der Zellen für Patch-Clamp- und Immunfluoreszenz-Experimente	29
2.2.9 Transiente Transfektion von Säugetierzellen	29
2.2.9.1 Transfektion von HEK293-Zellen	30
2.2.9.2 Transfektion der EAhy926-Zellen	30
2.3 Elektrophysiologische Methoden	31
2.3.1 Patch-Clamp-Technik an kultivierten Säugetierzellen	32
2.3.1.1 Patch-Clamp-Techniken	32
2.3.1.2 Patch-Clamp-Konfigurationen	32
2.3.1.3 Aufbau des Patch-Clamp-Messplatzes	34
2.3.1.4 Vorbereitungen	36
2.3.2 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	36
2.3.2.1 Isolierung von Oozyten aus <i>Xenopus laevis</i>	37

2.3.2.2 cRNS-Injektion der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	38
2.3.2.3 TEVC-Methode	38
2.3.2.4 Aufbau des TEVC-Messplatzes	39
2.3.2.5 Vorbereitung und Durchführung	39
2.3.3 Verwendete Lösungen und Puffer	40
2.3.3.1 Patch-Clamp-Verfahren	40
2.3.3.2 TEVC-Methode	41
2.4 Immunzytochemische Arbeiten	41
2.4.1 Vorbereitungen zur Immunfluoreszenzanalyse von HEK293-Zellen	41
2.4.2 Durchführung	41
2.4.3 Verwendete Puffer und Lösungen	43
2.5 Mitochondriale Fluoreszenzfärbung	43
2.6 Ca-Imaging (Fura-2AM-Assay)	44
2.6.1 Vorbereitungen	44
2.6.2 Durchführung	44
2.6.3 Verwendete Puffer und Lösungen	45
2.7 Detektion und Identifizierung von Proteinen per SDS-PAGE	46
3 Ergebnisse	47
3.1 Etablierung des Testsystems CHO-TREx-BK-α+β_1	47
3.1.1 Elektrophysiologische Charakterisierung des CHO-TREx-BK- α + β_1 -Klons	48
3.1.1.1 MaxiK-vermittelte Auswärtsströme in der Ganzzell-Konfiguration	48
3.1.1.2 Die Doxzyklin-abhängige Induktion von MaxiK-vermittelten Kaliumströmen	50
3.1.1.3 Inhibition MaxiK-vermittelter Kaliumströme	51
3.1.2 Funktioneller Nachweis der MaxiK- β_1 -Untereinheit	51
3.1.2.1 Die Kalzium-abhängige Aktivierung	52
3.1.2.2 Die Dehydrosoyasaponin-I-vermittelte Aktivierung	54
3.1.3 Die pH-Abhängigkeit	56
3.1.4 Untersuchungen zur Pharmakologie von direkten Aktivatoren des MaxiK Kanals in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	57
3.1.5 Analyse der Kanalaktivierung durch CGS7181	58
3.1.5.1 Elektrophysiologische Messungen an CHO-TREx-MaxiK- α + β_1 -Zellen	58
3.1.5.2 Ratiometrische Fluoreszenzuntersuchungen an HEK293-TREx-MaxiK- α + β_1 -Zellen	60
3.1.6 Analyse der Kanalaktivierung durch Pimarinsäure in CHO-TREx-MaxiK- α + β_1 -Zellen	64
3.1.7 Indirekte Kanalaktivierung durch Stimulation der löslichen Guanylatzyklase	65
3.1.8 Analyse der Kanalaktivierung durch Inhibitoren der Rho-Kinase	67
3.2 Die Spleißvariante MaxiK-$\alpha$$\Delta$S8	69
3.2.1 Untersuchung der Gewebe-Expression der MaxiK- α Δ S8-Variante	70
3.2.2 Expressionsanalyse in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten mittels TEVC	75
3.2.3 Untersuchungen zur Expression des MaxiK- α Δ S8-Proteins in HEK293-Zellen	75
3.2.3.1 Elektrophysiologische Untersuchungen	76
3.2.3.2 Immunzytochemischer Nachweis des MaxiK- α Δ S8-Proteins in transient transfizierten HEK293-Zellen	79
3.2.4 Dominanz-Negativ-Analyse des MaxiK- α Δ S8-Proteins in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten und HEK293-Zellen	84
3.2.4.1 Elektrophysiologische Untersuchungen in <i>Xenopus</i> Oozyten	84
3.2.4.2 Immunzytochemische Untersuchungen in HEK293-Zellen	85
3.2.5 Analyse der Stöchiometrie von MaxiK- α Δ S8-Multimeren in HEK293-Zellen	87
3.2.6 Analyse der MaxiK- α Δ S8-Lokalisation nach Mutation des carboxyterminalen RLR-Motivs	90
3.2.7 Immunzytochemische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation des MaxiK- α Δ S8-Proteins in HEK293-Zellen	91
3.2.8 Immunzytochemische Untersuchungen zur Expression des MaxiK- α Δ S8-Proteins in Glattmuskel- und Endothelzellen	92
4 Diskussion	94
4.1 Validierung des Testsystems CHO-TREx-MaxiK-α+β_1	94

4.2 Aktivatoren des MaxiK Kanals	97
4.3 Die Spleißvariante MaxiK-$\alpha\Delta S8$	101
5 Zusammenfassung	105
6 Anhang	107
6.1 Literaturverzeichnis	107
6.2 Danksagung	120
6.3 Curriculum vitae	122
6.4 Eidesstattliche Erklärung	123

Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
CHO-Zelle	Zelllinie aus den Ovarien des chinesischen Hamsters
[c]-DNS	[komplementäre] Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HEK293	Zelllinie aus humaner embryonaler Niere
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-Ethan-sulfonsäure
IP3	Inositoltriphosphat
KO	Knockout (-Mausmodell)
MOPS	3-(N-Morpholino-)propansulfonsäure
nt	Nukleotidposition
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PP	Polypropylen
[m]-RNS	[Boten]-Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-Kinase
RT	Raumtemperatur
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
TWEEN	Polyoxyethylensorbitan
Vol.	Volumen
Wt	Wildtyp

Einheiten

A	Ampere
Bp	Basenpaare
°C	Celsius-Grad
Da	Dalton
G	Gramm
H	Stunde
L	Liter
M	Meter
M	Molarität
Min	Minute
Mol	Mol
L	Liter
Ω	Ohm
OD	Optische Dichte
RT	Raumtemperatur
S	Siemens
S	Sekunde
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Xg	Gravitationskraft

Präfixes

Giga (G-)	10^9
Mega (M-)	10^6
Kilo (K-)	10^3
Zenti (c-)	10^{-2}
Milli (m-)	10^{-3}
Mikro (μ-)	10^{-6}
Nano (n-)	10^{-9}
Pico (p-)	10^{-12}

1 Einleitung

1.1 Bluthochdruck und seine medikamentöse Behandlung

Bluthochdruck stellt die am weitesten verbreitete Herz-Kreislaufkrankung der westlichen Welt dar (Hardman *et al.*, 2001). Etwa 50 Millionen Nordamerikaner und bis zu einer Milliarde Menschen weltweit (Chobanian *et al.*, 2003) leiden an Hypertonie, und diese Zahl wird in den kommenden Jahren durch die zunehmende Veralterung sowie die unausgewogene Lebensweise der Wohlstandsgesellschaft weiter zunehmen (Vasan *et al.*, 2002).

90% aller Patienten entwickeln im Laufe der Erkrankung die primäre essentielle Hypertonie, welche nicht Folge pathologischer Organveränderungen ist. Die Genese resultiert in einem Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen. Bluthochdruck ist neben der Hyperlipidämie, der Obesitas und dem Diabetes eine der vier Grundsäulen des metabolischen Syndroms und bildet den größten behandelbaren Risikofaktor für kardiovaskuläre Pathologien wie Schlaganfall, koronare Herzkrankheit, Herz- und Nierenversagen (Vasan *et al.*, 2002). Darüber hinaus sind diese vaskulären Erkrankungen als Spätfolge des Diabetes mellitus mortalitätsfördernd. Nach der WHO (1999) lässt sich die Hypertonie in drei Schweregrade einteilen:

- Stadium I: Erhöhung des Bluthochdrucks ohne organische Veränderungen am Herz-Kreislauf-System
- Stadium II: mindestens eine der folgenden Organveränderungen: Augenhintergrundveränderung, Proteinurie bzw. Erhöhung des Plasmakreatinin-Spiegels
- Stadium III: Herzinsuffizienz, zerebrale Durchblutungsstörungen und Nierenschäden

Der Hypertoniker sollte durch Eigeninitiative wie Einstellen des Rauchens, körperliche Bewegung, diätetische Maßnahmen wie Einschränkung der Kochsalzzufuhr und Gewichtsreduktion bei Übergewichtigen einiges zur Verbesserung des Krankheitsbildes beitragen. Ansonsten kann im Falle der primären essentiellen Hypertonie eine medikamentöse Therapie den Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen. Nach einer Empfehlung der Deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdrucks sollten Patienten bei einem diastolischen Blutdruck über 94mm Hg in jedem Fall, bei Drücken zwischen 90-94mm Hg in Abhängigkeit von weiteren Risikofaktoren (Adipositas, Nikotinsucht, etc.) medikamentös behandelt werden. Auf diese Weise wurde seit den 70er Jahren durch die Bekämpfung des Bluthochdrucks die (altersangepasste) Mortalitätsrate für Schlaganfall und koronare Herzerkrankung um 50% bzw. 35% erniedrigt (Hardman *et al.*, 2001). Im Zusammenhang mit letzterer Krankheit belegen zahlreiche klinische Studien der letzten Jahre darüber hinaus die Wirksamkeit der Antihypertensivtherapie für die Behandlung der Atherosklerose (Pepine, 2004). Eine Normalisierung

des Blutdrucks, d.h., eine Senkung des diastolischen Blutdrucks auf unter 90mm Hg sowie des systolischen Wertes auf unter 140mm Hg stellt den therapeutischen Zielpunkt dar.

Substanzklasse	Wirkung	Wirkort	Wirkstoffe (Beispiele)
Diuretika	Natriurese (Schleifendiuretika, Thiazide) Kaliumsparer	Niere	Furosemid, Hydrochlorothiazid Triamteren
Sympatholytika	Blockade von β -Rezeptoren	Herz, VNS	Propranolol, Sotalol, Metoprolol, Atenolol
	Blockade von α_1 -Rezeptoren	Gefäßmuskel, VNS	Prazosin, Doxazosin Tamsulosin, Urapidil
Antisymphotonika	α_2 -Sympathomimetika Noradrenalin-Speicherung bzw. Freisetzung beeinflussende Sub- stanzen	ZNS	Clonidin, Guanfacin, Moxonidin, Methyldopa Reserpin
ACE-Hemmer	Hemmung der Bildung von Angiotensin II	Niere, Gefäß	Ramipril, Enalapril Captopril, Lisinopril
AT ₁ -Blocker	Angiotensin II-Rezeptor Inhibition	Niere, Gefäß	Losartan, Candesartan, Irbesartan
Kalziumkanalblocker	Blockade von L-Typ Ca ²⁺ Kanälen	Gefäßmuskel, Herz	Nifedipin, Verapamil Diltiazem
Vasodilatoren	Senkung des peripheren Widerstandes durch Angriff an kleineren Arterien und Arteriolen	Gefäßmuskel	Dihydralazin Diazoxide Minoxidil Natriumnitroprussid
Aldosteron- Antagonisten	Blockade Aldosteron-Rezeptor	Niere	Spirolacton

Tabelle1: Übersicht der gebräuchlichsten Antihypertensiva und ihrer postulierten Wirkprofile.
Abkürzungen: ACE, Angiotensin-converting enzyme; AT₁, Angiotensin-Rezeptor Typ1; VNS, vegetati-
ves Nervensystem; ZNS, zentrales Nervensystem

Gebräuchliche Antihypertensiva (und auch die physiologischen Kontrollmechanismen) beein-
flussen den systemischen Blutdruck im wesentlichen durch eine Erniedrigung des peripheren
Widerstandes und des Herzzeitvolumens. Mittel der ersten Wahl sind dabei β -Adreno-
rezeptor-Blocker, ACE-Hemmer, Diuretika, AT₁-Rezeptor-Antagonisten, Kalziumkanal-
Antagonisten, Vasodilatoren und α_1 -Adrenorezeptor -Blocker (siehe Tab.1).

Diuretika erhöhen die Harnausscheidung durch die Niere und senken dadurch das Herzzeitvolumen. Zusätzlich führen sie zu einer Dilatation der präkapillären Widerstandsgefäße; dieser Prozeß ist an die Freisetzung von Prostaglandinen gebunden, ohne dass der genaue Mechanismus geklärt ist (Mutschler et al., 2003). α - und β -adrenerge Antagonisten hemmen die Gefäßkonstriktion nach Aktivierung des Sympathikus sowie dessen positive Wirkung auf Inotropie und Chronotropie der Herzmuskulatur. Inhibitoren des Angiotensin-converting-enzymes (ACE) sowie AT_1 -Antagonisten hemmen die Bildung bzw. Rezeption von Angiotensin II und unterbinden damit die vasokonstriktorische Wirkung des Peptidhormons. Die Blockade von glattmuskulären spannungsabhängigen Kalziumkanälen unterliegt dem Effekt von Kalziumkanal-Inhibitoren wie Verapamil und Nifedepin. Vasodilatoren wie Diazoxid und Natriumnitroprussid wirken durch diverse Mechanismen wie z.B. die Öffnung von vaskulären K_{ATP} -Kanälen.

Da keiner der aufgeführten Wirkstoffe und Therapien frei von Nebeneffekten ist, und oftmals eine ausreichende Blutdrucksenkung durch eine Monotherapie nicht möglich ist, wird inzwischen in der Praxis oft eine Kombinationsmedikation verschiedener Antihypertensiva zur effektiven Kontrolle des Blutdrucks verwendet. Demnach besteht für eine große Zahl von Patienten mit schwerer essentieller Hypertonie ein medizinischer Bedarf an neuen und sicheren antihypertensiven Wirkstoffen.

Bei der Suche nach innovativen, blutdrucksenkenden Prinzipien sollte man von zwei wichtigen Bedingungen ausgehen: zum einen muss die Zielstruktur bzw. das Zielprotein in seiner physiologischen Funktion einen großen Einfluss auf die Blutdruckregulation besitzen, zum anderen sollte die Expression möglichst spezifisch im Zielgewebe vorliegen, um das Ausmaß an Nebenwirkungen einzuschränken.

1.2 Physiologie der Gefäßwand

Bei der Wahl des geeigneten Angriffsortes neuartiger Antihypertensiva steht das Gefäßsystem an erster Stelle. Die vaskuläre Physiologie wird im wesentlichen durch das Zusammenspiel zweier Zelltypen, des Endothels und der glatten Gefäßmuskulatur geprägt. Sowohl die kurzzeitigen Änderungen im Gefäßdurchmesser durch Vasokonstriktion und –dilatation als auch die längerfristigen Prozesse der vaskulären Morphogenese beeinflussen Gefäßwiderstand und Blutdruck.

Die luminale Auskleidung der Gefäße erfolgt durch das Endothel, welches den Stofftransport ermöglicht und darüber hinaus für die Rezeption von humoralen Botenstoffen wie Angio-

tensin II, Bradykinin, Östrogen und Vasopressin verantwortlich ist (Mutschler et al., 2003). Erst in den letzten Jahren wurde erkannt, dass darüber hinaus die Bildung von freien Sauerstoff-Radikalen in Endothelzellen, zum Beispiel durch „advanced glycation endproducts (Basta et al., 2002) zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege führt (Touyz, 2000b; Touyz, 2000a). Damit sind Störungen der Gefäßwand-Homöostase verbunden, die unter dem Begriff „endotheliale Dysfunktion“ zusammengefasst werden; Verletzungen und Entzündungen der Endothelschicht bilden den Startpunkt zur Ausbildung atherosklerotischer Plaques, welche die Gefahr eines späteren Gefäßverschlusses und damit einer koronaren Herzerkrankung drastisch erhöhen (Wierzbicki et al., 2004).

Die angrenzende Glattmuskulatur ermöglicht die Konstriktion und Dilatation des Gefäßes. Man kann es als ein funktionelles Synzytium betrachten, in dem die grundlegende myogene Aktivität des Zellverbandes zumeist durch die elektrische Aktivität von Schrittmacherzellen bestimmt und durch niederohmige Kontakte auf andere Muskelzellen übertragen wird. Eine Membrandepolarisation ist dabei mit einer Kontraktion verbunden, eine Repolarisation führt zur Erschlaffung. Die myogene Aktivität wird neben muskel-intrinsischen Faktoren durch die Wirkung lokaler Gewebsbotenstoffe (z.B. Prostaglandine) sowie humoraler (z.B. Noradrenalin) und endothelialer Faktoren (z.B. NO) überlagert. Die Integration dieser unterschiedlichen Agenzien erfolgt durch komplexe Signaltransduktionskaskaden in den Myozyten des Gefäßsystems (s. Abb.1).

Die entscheidende Modifikation, welche die Bewegung der Aktin-Myosin-Filamente und damit die Muskelkontraktion auslöst, ist die Phosphorylierung des Myosins (Ikemoto & Yamamoto, 2000) . Das Gleichgewicht zwischen phosphoryliertem und dephosphoryliertem Myosin wird durch die Aktivität der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) und ihres Gegenspielers, der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP), bestimmt. Dem intrazellulärem Kalzium kommt eine Schlüsselrolle für die Regulation der MLCK und damit des Muskeltonus zu (Ogut & Brozovich, 2003). Steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration an, wird durch Bindung von Ca^{2+} -Calmodulin die Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) aktiviert, die wiederum eine Aktivierung der MLCK und damit eine Muskelkontraktion hervorruft. Im Gegenzug führt ein Absinken des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zur Vasorelaxation. Neben den Ca^{2+} -abhängigen Signalwegen existieren eine Reihe von Ca^{2+} -unabhängigen Prozessen, die ebenfalls die Aktivitäten von MLCK und MLCP beeinflussen und dadurch die Kontraktilität der Gefäßmuskeln regulieren.

Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration unterliegt aufgrund ihrer Bedeutung für die Muskelkontraktion und einer Vielzahl anderer zellulärer Prozesse einer strikten Kontrolle (siehe Abb.1, grünlicher Signalweg). Die Ca^{2+} -Ruhekonzentration im Zytosol beträgt etwa 100 nM

(Schmidt *et al.*, 2000). Während der Muskelkontraktion steigt die Ca^{2+} Konzentration dagegen auf Werte >500 nM an (Harnett & Biancani, 2003). Diese Kalziumerhöhungen werden durch den Einstrom des Ions aus dem Extrazellulärraum sowie durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern im ER realisiert. Der Einstrom von extrazellulärem Kalzium erfolgt durch plasmamembranständige Ionenkanäle und Transporter, wobei der spannungsabhängige L-Typ-Kalziumkanal den bedeutendsten Influxweg darstellt. Dieser Kanal öffnet mit zunehmender Depolarisation der Muskelzellmembran und setzt damit neuronal oder myogen ausgelöste Aktionspotentiale in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderungen und Muskelaktivität um.

Viele der vasoaktiven Faktoren entfalten ihre Wirkung durch Bindung an heptahelikale G-Protein gekoppelte Rezeptoren. So führen α_1 -adrenerge Rezeptoren nach Bindung von Noradrenalin zur Kontraktion der Muskelzellen infolge einer Aktivierung des Inositol-1,4,5 triphosphat-Signalweges (IP_3 -Weg, siehe Abb.1, rötlicher Signalweg). Dabei wird zunächst die membranständige PLC durch die α -Untereinheiten von $\text{G}_{q/11}$ -Proteinen, welche sich nach Bindung von GTP vom Liganden-aktivierten Rezeptor lösen, stimuliert. Aktivierte PLC hydrolysiert daraufhin Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP_2) und bildet daraus die sekundären Botenstoffe IP_3 und Diacylglycerin (DAG). IP_3 diffundiert in das Zytosol und bindet an den IP_3 -Rezeptor, einen Kalziumkanal des endoplasmatischen Retikulums mit hoher Leitfähigkeit. Der durch IP_3 ausgelöste Austritt von Ca^{2+} aus dem ER ins Zytosol stellt das Signal für die Kontraktion durch den Aktin-Myosin-Apparat dar. Der zweite Botenstoff DAG diffundiert lateral in der Membran und aktiviert zahlreiche Zielproteine, darunter auch bestimmte PKC-Isoformen, die den Kontraktionsprozess positiv beeinflussen.

Andere konstriktorische Signalwege erhöhen nicht den intrazellulären Kalziumspiegel, sondern verstärken die Antwort auf eine Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration. Dieser Vorgang wird als Ca^{2+} -Sensitivierung bezeichnet. Ein wichtiges an der Ca^{2+} -Sensitivierung beteiligtes Protein ist die Rho-Kinase, die durch Stimulation der MLCK und Inhibition der MLCP (Fukata *et al.*, 2001) zu einer erhöhten Vasokonstriktion beiträgt. Die Aktivität der Rho-Kinase wird sowohl über $\text{G}_{12/13}$ -gekoppelte- (z.B. Thromboxan A2) als auch eine Reihe $\text{G}_{q/11}$ -gekoppelter Rezeptoren (z.B. für Angiotensin II, Vasopressin) reguliert (Somlyo & Somlyo, 2003) (siehe Abb.1, oranger Signalweg). Die stimulierten heterotrimeren G-Proteine wirken dabei auf Rho-GEFs (GEFs, guanine nucleotide exchange factors) ein, die ihrerseits den Austausch von GDP gegen GTP am RhoA/RhoGDI Komplex katalysieren. Als Folge der GTP-Bindung interagiert nun RhoA-GTP mit der Rho-Kinase und aktiviert diese.

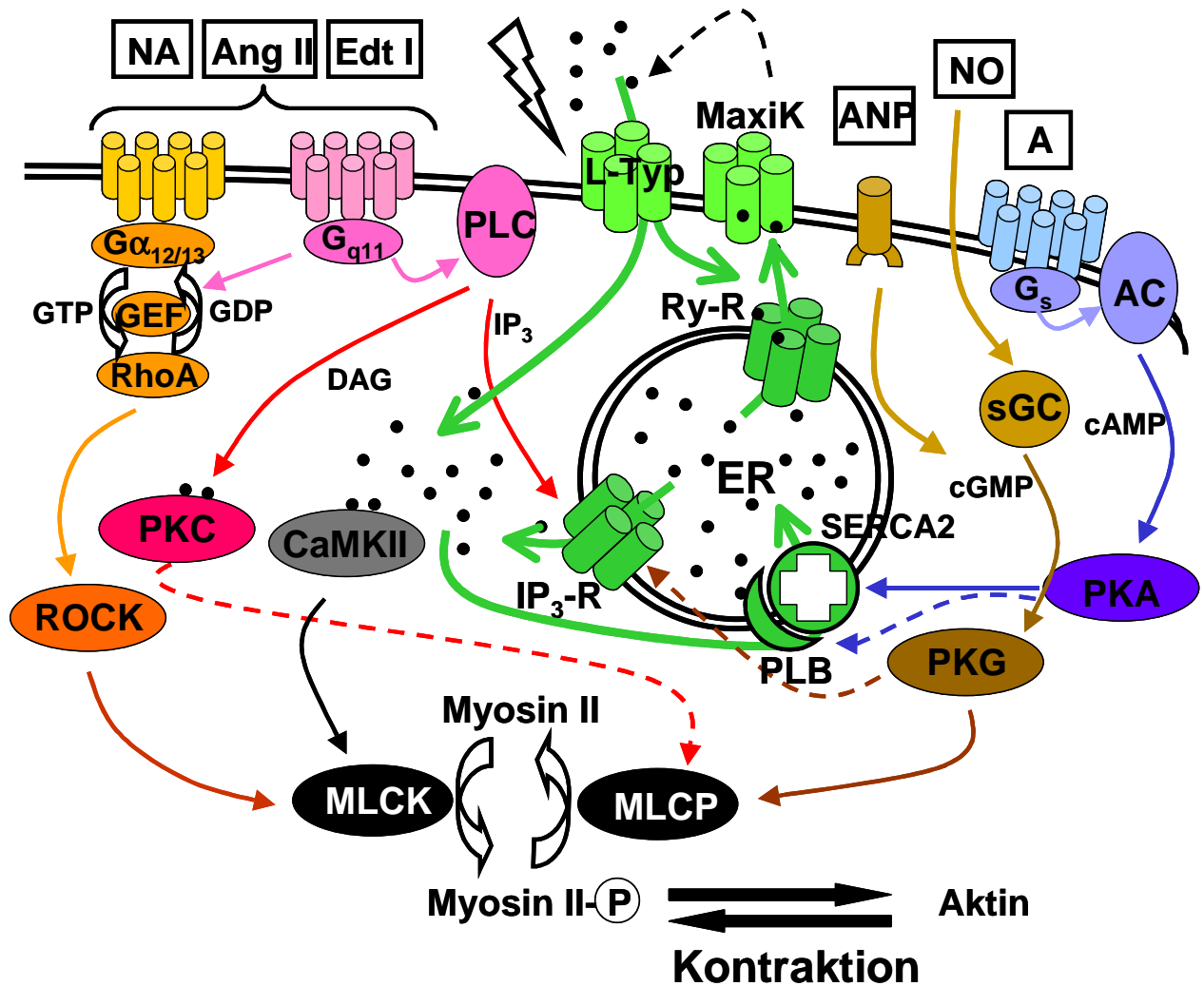


Abb.1: Vereinfachtes Schema der Signalwege in vaskulären Glattmuskelzellen. Dargestellt sind nur einige grundlegende Interaktionen, insbesondere die Regulationen der Proteinkinasen auf die Plasmamembran-nahen Signalwege sind der Übersichtlichkeit halber weggelassen. Interaktionen: Aktivierung, durchgezogener Pfeil; Inhibition, gestrichelter Pfeil; Flux und Transport: durchgezogener Pfeil mit offener Spitze. Membranen sind durch Doppellinien gekennzeichnet; der Blitz stellt die Membrandepolarisation dar, Ca^{2+} -Ionen sind durch kleine schwarze Rauten beschrieben. Abkürzungen: A, Adrenalin; AC, Adenylatzyklase; AngII, Angiotensin II; ANP, atriuretisches Peptid; CaMKII, Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II; cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat; cGMP, zyklisches Guanosinmonophosphat; Edtl, Endothelin I; ER, endoplasmatisches Retikulum; Gxx, G-Protein; DAG, Diazylglyzerin; GEF, G-Protein exchange factor; GT(D)P, Guanosin(di)phosphat; IP_3 , Inositoltriphosphat; IP_3 -R, IP_3 -Rezeptor; L-Typ, spannungabhängiger Kalziumkanal des L-Typs; MLCK, Myosin-Leichtketten-Kinase; MLCP, Myosin-Leichtketten-Phosphatase; NA, Noradrenalin; NO, Nitrosylmonooxid; PKA, Proteinkinase A; PKC, Proteinkinase C; PKG, Proteinkinase G; PLB, Phospholamban; PLC, Phospholipase C; RhoA, (monomeres) G-Protein vom Typ A; ROCK, Rho-Kinase; Ry-R, Ryanodin-Rezeptor; SERCA2, ATP-abhängiger Kalziumtransporter des endo/sarkoplasmatischen Retikulums; sGC, lösliche Guanylatzyklase.

G_s -Protein-gekoppelte Rezeptoren der glatten Muskelzelle, z.B. β -adrenerge Rezeptoren, führen zur Bildung von cAMP, indem die α -Untereinheiten des heterotrimeren G_s -Proteins nach Dissoziation von ihren $G\beta\gamma$ -Untereinheiten die membranständige Adenylatzyklase stimulieren (bläulicher Signalweg). Die nachfolgende Aktivierung der Proteinkinase PKA erhöht u.a. per Phosphorylierung die Aufnahme von Ca^{2+} ins sarkoplasmatische Retikulum

durch Stimulation der Kalziumpumpe SERCA (und entsprechend durch Inhibition ihres negativen Regulators Phospholamban), wodurch die Muskelrelaxation begünstigt wird.

Guanylatzyklen, welche cGMP bilden, stellen selbst Rezeptoren dar, die membranständig (mit dem Liganden atriales natriuretisches Peptid) oder zytoplasmatisch (Aktivierung durch NO) vorliegen (Abb.1, bräunlicher Signalweg). cGMP aktiviert die Proteinkinase PKG, welche nachfolgend pleiotrope Wirkungen wie die Inhibition des IP₃-Rezeptor sowie Aktivierung von BK Kanälen und MLCP initiiert (Carvajal *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998). PKG inhibiert darüber hinaus RhoA und verhindert so die Aktivierung der Rho-Kinase (in Abb.1 nicht dargestellt) (Chitaley & Webb, 2002).

1.3 Regulation des Membranpotentials in glatten Muskelzellen durch Kaliumkanäle

Für die Kontraktion der glatten Muskelzelle ist ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration essentiell (Somlyo & Somlyo, 1994; Somlyo & Somlyo, 2003). Der Einstrom von Kalzium wiederum ist abhängig vom Membranpotential der Zelle und seinen Veränderungen. Wie in Abschnitt 1.2 erläutert führt eine Membrandepolarisation zur Öffnung spannungsabhängiger Ca²⁺ Kanäle und Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels.

Gemäß der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung¹ (Hodgkin & Katz, 1949) wird das Membranpotential von den intra- und extrazellulären Konzentrationen aller anwesenden Ionensorten sowie ihren relativen Permeabilitäten bestimmt. Im Ruhezustand sind die Permeabilitäten für Kalium- und Chlorid-Ionen deutlich grösser als die für andere Ionen, so dass das Ruhemembranpotential hauptsächlich durch die Verteilung von K⁺ und Cl⁻ bestimmt wird. Die physiologischen Konzentrationsgradienten von Kalium und Chlorid ($[K^+]_i \approx 155 \text{ mM} > [K^+]_a \approx 4 \text{ mM}$ und $[Cl^-]_i \approx 4 \text{ mM} < [Cl^-]_a \approx 120 \text{ mM}$ (Schmidt *et al.*, 2000)) bedingen, dass sich im Fließgleichgewicht ein negatives Potential auf der Membraninnenseite im Vergleich zur Außenseite ausbildet, welches in der glatten Muskelzelle etwa -60mV beträgt (Hille, 2003). Eine Erhöhung der relativen Kaliumpermeabilität verschiebt das Membranpotential in Richtung des Nernstpotentials für K⁺ von etwa -90mV und stellt den wichtigsten Mechanismus zur Repolarisation von Glattmuskelzellen dar. Dabei werden als Antwort auf eine Membrandepolarisation spannungsabhängige Kaliumkanäle aktiviert, die eine Rückführung ins Ruhemembranpotential ermöglichen. Die Aktivität von spannungsabhängigen K⁺-Kanälen leistet daher einen wichtigen Beitrag für die Dämpfung der Zelleregung und die Aufrechterhaltung des basalen myogenen Tonus (Jackson, 2000).

¹
$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\sum P_A [A]_{innen} + \sum P_K [K]_{außen}}{\sum P_A [A]_{ausßen} + \sum P_K [K]_{innen}} \right)$$
 mit [A], [K] = Konzentration der Anionen A bzw. Kationen K
P_A, P_K = Permeabilität der Anionen A bzw. Kationen K
(gilt in dieser Form nur für einwertige Ionen)

Darüber hinaus koppelt die Muskelzelle mittels des kaliumpermeablen K_{ATP} -Kanals, einem Komplex aus dem Einwärts-Rektifizierer Kir6.2 und dem SUR2B-Rezeptor, den Zellmetabolismus an membranäre Vorgänge (Quayle *et al.*, 1997). Sinkende intrazelluläre ATP-Spiegel führen zu einer Aktivierung des Kanals und damit zu einer Erniedrigung des Membranpotentials, wodurch die physiologische Aktivität der Muskulatur sowie der Energieverbrauch reduziert wird.

Nicht nur eine Depolarisation *per se* sondern auch die damit verbundene Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration löst einen negativen Rückkopplungsmechanismus aus, der zur Repolarisation und Vasodilatation führt. Das einströmende Kalzium aktiviert dabei Ryanodinrezeptoren (RyR) im sarkoplasmatischen Retikulum. Da dieses Zellkompartiment Kalzium in hoher Konzentration enthält, kommt es zu einem Ausstrom des Ions ins Zytoplasma. Bekannt sind bislang drei Isoformen des RyR, deren mRNS im vaskulären Glattmuskel nachgewiesen werden konnten (Loehn *et al.*, 2001). Dagegen ist RyR1 die dominante Isoform im Skelettmuskel und RyR3 die dominante Variante im Herzen. RyR1 und RyR2 sind in Glattmuskelzellen funktionell eng mit Ionenkanälen der Plasmamembran gekoppelt, dazu zählen in erster Linie BK-Kanäle sowie in einigen Glattmuskelzellen auch Ca-aktivierte Chloridkanäle; demgegenüber sind spannungsaktivierte Calciumkanäle nur schwach gekoppelt (Herrera & Nelson, 2002). Es wird vermutet, dass diese lokale Kopplungsmechanismen auf einer spezifischen räumlichen Organisation von RyR-Isoformen und den plasmamembranären Ionenkanälen in glatten Muskelzellen beruht (Gollasch *et al.*, 2000; Jaggar *et al.*, 2000). Im Falle der MaxiK-Kanäle aktivieren die lokalen RyR-vermittelten Kalziumerhöhungen, sogenannte „sparks“, die Kaliumkanäle, was spontane, transiente Kaliumauswärtsströme (STOCs) zur Folge hat (Nelson *et al.*, 1995). Jeder Ca^{2+} -spark ruft dabei einen STOC hervor und größere Ca^{2+} -sparks generieren größere Kaliumströme. Im Falle der BK-Kanäle ist die glattmuskelspezifische β_1 -Untereinheit an der räumlichen Kopplung von RyR1 und RyR2 direkt beteiligt, da in β_1 KO-Mäusen die funktionelle Kopplung von Ca^{2+} -spark und BK-Aktivierung nicht mehr auftritt (Brenner *et al.*, 2000a). PKC und PKA wirken modulierend auf diese Kopplung ein (Bonev *et al.*, 1997; Jaggar *et al.*, 2002). Damit bildet dieser Kaliumkanal eine wesentliche Komponente der negativen, Kalzium-induzierten Rückkopplung und ist dementsprechend komplex reguliert. Diese zentrale Stellung hat dazu geführt, dass in den letzten Jahren Expression, Funktion und Pharmakologie des MaxiK-Proteinkomplexes intensiv studiert worden sind.

1.4 Der MaxiK Kanal

Kalzium-aktivierte Kaliumkanäle bilden eine funktionelle Klasse, deren Mitglieder SK-(small K⁺ conductance), IK-(intermediate K⁺ conductance), und MaxiK- (big K⁺ conductance) Kanäle mit Ausnahme der grundlegenden 6-Transmembrandomänenstruktur untereinander nur wenig Homologie aufweisen (Jensen *et al.*, 2001; Vergara *et al.*, 1998). Sie existieren in Vertebraten und Nicht-Vertebraten und wurden erstmals in Mollusken-Neuronen identifiziert (Meech, 1978; Hermann & Hartung, 1983).

SK-Kanäle, von denen bislang drei Gene identifiziert wurden, besitzen Einzelkanalleitfähigkeiten von 5-10pS und lassen sich pharmakologisch durch die Sensitivität gegenüber dem Bienengift Apamin voneinander unterscheiden (Ishii *et al.*, 1997a; Ishii *et al.*, 1997b; Shah & Haylett, 2000). Sie werden in erregbaren Zellen wie Neuronen und Skelettmuskeln exprimiert und spielen dort eine Rolle bei der Nachhyperpolarisation und der Aktionspotential-Frequenzadaptation (Sah, 1996). Ihre Ca²⁺-Sensitivität wird durch das assoziierte Calmodulin-Protein vermittelt. Der intermediäre IK Kanal (SK4 oder Gardos-Kanal) wurde erstmalig in Erythrocyten identifiziert (Gardos, 1958) und aus einer Pankreas-cDNS-Bank kloniert (Ishii *et al.*, 1997b); seine Expression ist auf nicht-erregbare Zellen wie Blutzellen sowie Epithel- und Endothelgewebe (Jensen *et al.*, 2001) beschränkt. Die Einzelkanalleitfähigkeit beträgt 20-40pS und lässt sich durch das Skorpionsgift Charybdotoxin unterbinden. Pharmazeutisch bedeutsam ist die Inhibition durch Clotrimazol. Die Funktion des IK Kanals liegt vornehmlich in der Volumenkontrolle und Regulation der Fluidsekretion.

MaxiK Kanäle weisen nur eine geringe Homologie zu den Familienmitgliedern auf und werden als einzige neben der Kalziumkonzentration auch durch eine Membranpotential-Depolarisation aktiviert. Sie besitzen mit 100-250pS (in Abhängigkeit von der extrazellulären K⁺-Konzentration) die höchste Einzelkanalleitfähigkeit aller bekannten Kaliumkanäle und werden in nahezu allen erregbaren Geweben (eine Ausnahme scheint das Myokard zu sein) exprimiert. Wie SK-Kanäle werden sie durch Charybdotoxin und darüber hinaus durch das Skorpionsgift Iberiotoxin inhibiert. Des Weiteren hemmt Paxillin (Knaus *et al.*, 1994c) spezifisch MaxiK-generierte Kaliumströme; Tetraethylammonium- (TEA) und Bariumionen inhibieren dagegen unspezifisch.

Die erste MaxiK- α -Untereinheit wurde aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als „Slowpoke²“-Gen kloniert (Atkinson *et al.*, 1991), daher auch oft als slo1-Protein bezeichnet und kurz darauf funktionell exprimiert (Adelman *et al.*, 1992). Da die Primärsequenz innerhalb der Vertebraten sehr konserviert ist, wurden die Homologe der Maus (Butler *et al.*, 1993), des Menschen (Dworetzky *et al.*, 1994) und anderer Säuger wenig später identifiziert. Bislang sind zwei weitere Gene der slo-Familie identifiziert worden. slo2.1, Slick (Wei *et al.*,

² Der Name (slowpoke = Langweiler) leitet sich von dem entsprechenden Verhalten der *Drosophila*-Mutante ab.

1996), bzw. das Ratten-Ortholog slo2.2, Slack (Schreiber *et al.*, 1998), kodieren Kaliumkanäle, die durch intrazelluläre Na⁺-Ionen (und wohl auch Cl⁻-Ionen) stimuliert werden (Yuan *et al.*, 2003); slo3 (Schreiber *et al.*, 1998) wird vor allem in Spermatozyten exprimiert und bildet einen spannungs- und pH-abhängigen Kaliumkanal.

Das humane MaxiK- α -Protein besitzt eine Molmasse von 125 kDa; die kodierende Sequenz umfasst 3582 bp. Damit ist er mehr als doppelt so groß wie SK und IK Kanäle.

Durch Expression von nativen und mutierten α -Proteinen konnte nachgewiesen werden, dass die Untereinheit im funktionellen Kanal als Tetramer vorliegt (Shen *et al.*, 1994), wie es auch bei spannungsaktivierten K_v-Kanälen der Fall ist. Darüber hinaus existieren einige weitere Gemeinsamkeiten in Primärsequenz und Tertiärstruktur (siehe Abb.2).

Zunächst wurden in Übereinstimmung zur Kv-Familie sechs Transmembrandomänen S1-S6 postuliert. Zwischen S5 und S6 befindet sich eine Einstülpung des Proteins in die Membran, die die Porenauskleidung bildet. Die Pore ist K⁺-selektiv und besitzt eine konservierte GYG-Sequenz, die in den meisten Kaliumkanälen vorkommt (Heginbotham *et al.*, 1994). Am inneren Porende befindet sich ein MaxiK-spezifischer Ring aus acht negativ geladenen Glutamatresten, welcher die Leitfähigkeit aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit den K⁺-Ionen etwa verdoppelt (Brelidze *et al.*, 2003).

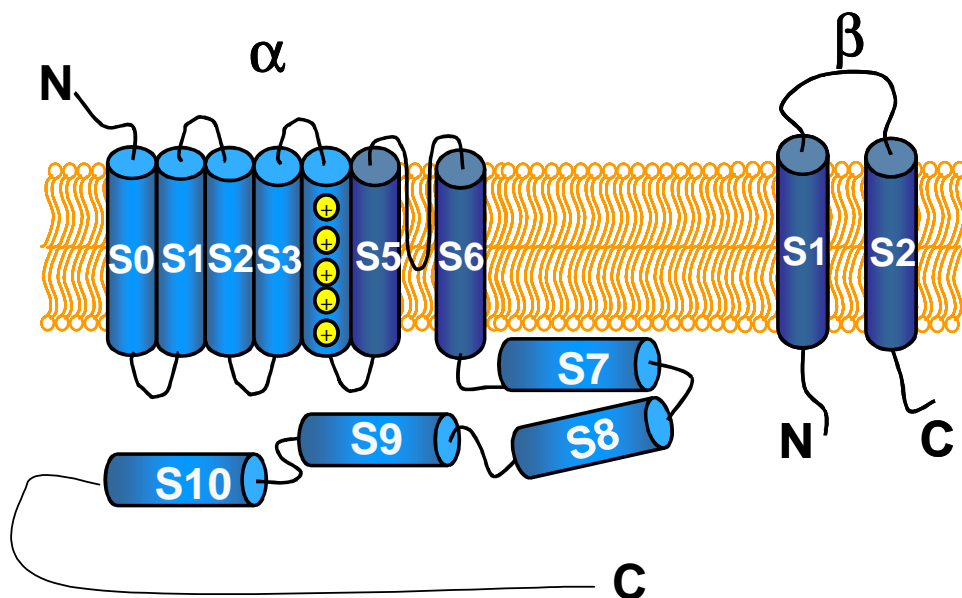


Abb.2: Postulierte Struktur des MaxiK Kanals mit je einem α - und β -Protein. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Proteine zweidimensional dargestellt. Da bislang weder α noch β röntgenspektroskopisch untersucht werden konnten, stützt sich diese Darstellung auf theoretische Modellberechnungen und experimentelle Befunde. Die Röntgenstrukturanalyse des MthK-Kanals (Jiang *et al.*, 2002a) lieferte kürzlich ein differenzierteres Bild eines Kalzium-aktivierten Kaliumkanals (siehe Text).

Das S4-Segment enthält eine charakteristische Arginin-Abfolge an jeder dritten Position der Transmembranhelix. In Analogie zum spannungsabhängigen Natriumkanal (Papazian *et al.*, 1991) wurde dieses Segment als Spannungssensor identifiziert. Nach röntgenkristallographischen Untersuchungen an bakteriellen Kv-Kanälen folgte die Annahme, dass bei einer Potentialänderung der Membran die S4-Domäne eine rotatorische Bewegung in der Membranebene durchführt, die eine Öffnung der Porenstruktur verursacht (Jiang *et al.*, 2003). Glykosylierungsstudien des Aminoterminus führten zu dem Erkenntnis, dass dieser im Gegensatz zu den meisten anderen Kanälen extrazellulär lokalisiert ist (Wallner *et al.*, 1996). Die dazu notwendige zusätzliche Durchquerung der Membran im Aminoterminus wurde daher als S0-Domäne bezeichnet, um die Nomenklatur der konservierten S1-S6 Domänen beizubehalten.

Der ungewöhnlich große Carboxyterminus, der etwa 2/3 des gesamten Proteins ausmacht, ist eine weitere MaxiK-typische Struktur. Hydropathizitätsanalysen führten zunächst zur Identifizierung vier weiterer hydrophober Domänen im membranahen Bereich, die in ihrer sequenziellen Anordnung als S7-S10-Domänen bezeichnet wurden und an die sich ein ungeordneter membranferner Bereich anschließt. Durch einen systematischen Vergleich der unterschiedlichen Ca²⁺-Affinitäten zwischen Maus- und Drosophila-Kanal wurde zunächst die membranferne Region (S9-S10) als Ca²⁺-Binderegion, die sogenannte Ca²⁺-Bowl beschrieben (Wei *et al.*, 1994; Schreiber *et al.*, 1999). Bindungsexperimente mit ⁴⁵Ca²⁺ wiesen jedoch nach, dass nur etwa die Hälfte der Kationen mit diesem Bereich interagiert (Bian *et al.*, 2001).

Eine Röntgenkristallstruktur des Ca²⁺-aktivierten MthK-Kanals aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* lieferte zuletzt den Nachweis, dass der homologe Abschnitt des membranahen Carboxyterminus im bakteriellen Kanal zwei Ca²⁺-Atome bindet, jeweils in einer Unterstruktur, die als RCK-Domäne (engl. regulators of K⁺ conductance) bezeichnet wird (Jiang *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2002a; Jiang *et al.*, 2002b). Im funktionellen Kanaltetramer bildet der Oktamer aus RCK-Domänen einen Ring am intrazellulären Ende der Porenstruktur. Nach Bindung der Kalziumatome erfahren sie eine rotatorische Konformationsänderung, die den unteren Bereich der Pore öffnet. Damit wirkt Ca²⁺ als Modulator, indem die Bindung zu einer Erniedrigung der Energiebarriere führt, die durch die Spannungsaktivierung überwunden werden muss (Orio *et al.*, 2002). Dennoch muss davon ausgegangen werden, dass weitere Kalziumbindungsstellen existieren. Es gibt Hinweise darauf, dass auch nach Entfernung der RCK Domäne sowie der Ca²⁺-Bowl noch eine Aktivierung der MaxiK Kanäle durch Kalzium stattfindet (Piskorowski & Aldrich, 2002).

Das MaxiK- α -Protein wird nur von einem Gen kodiert. Obwohl MaxiK-Transkripte in den meisten Organen detektiert wurden, zeigten MaxiK- α -defiziente Mäuse einen relativ modera-

ten Phänotyp zu dem neben neurologischen Störungen (Ataxien und cerebellare Degenerationen) und einem progressiven Hörverlust im Hochfrequenzbereich (Ruttiger *et al.*, 2004) eine Zunahme des Blutdrucks gehört (P. Ruth, pers. Mitteilung).

MaxiK-vermittelte Ströme in verschiedenen Geweben besitzen eine erhebliche Diversität hinsichtlich ihrer biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften. Dafür werden im wesentlichen drei Mechanismen verantwortlich gemacht (Korovkina & England, 2002): (1) Die Assoziation mit Hilfsuntereinheiten, (2) die posttranslationale Modifikation und Einbettung in intrazelluläre Signalwege und (3) eine ungewöhnliche Vielfalt an alternativen Spleißisoformen.

Die regulatorischen β -Untereinheiten bestehen aus zwei transmembranären Segmenten verbunden durch einen extrazellulären Bereich (siehe Abb.2); Amino- und Carboxyterminus liegen auf der zytoplasmatischen Seite. Bislang sind dies die einzigen Hilfsuntereinheiten, die in Vertebraten gefunden werden konnten³. Obwohl die Stöchiometrie im funktionellen Kanal unbekannt ist, wird angenommen, dass jeweils ein β - mit einem α -Protein über dessen S0-Segment interagiert (Knaus *et al.*, 1994a; Knaus *et al.*, 1994b). In Analogie zu Kv-Kanälen bestehen funktionelle MaxiK Kanalkomplexe aus 4 α -Untereinheiten (Shen *et al.*, 1994), die möglicherweise mit 4 β - Proteinen assoziiert sein können. Bislang sind vier verschiedene β -Untereinheiten kloniert worden (Patterson *et al.*, 2002), die erheblichen Einfluss auf die Eigenschaften der MaxiK-Komplexe nehmen⁴. Die β_1 -Untereinheit ist fast ausschließlich im Gefäßmuskel exprimiert. Sie scheint in diesem Gewebe die einzige Hilfsuntereinheit des α -Proteins darzustellen (Tanaka *et al.*, 1997) und führt sowohl zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des α -Proteins in Anwesenheit von Kalzium als auch zur Verlangsamung von Aktivierung und Deaktivierung (Jiang *et al.*, 1999). Durch die Affinitätserhöhung des MaxiK Kanal-Komplexes für Kalzium bestimmt die vaskuläre β_1 -Untereinheit in großen Maße die physiologische Aktivität von Gefäßen mit. β_1 -defiziente Mäuse weisen eine gestörte Kopplung zwischen der Ca^{2+} -Freisetzung aus den Ryanodinrezeptoren und MaxiK Kanälen auf, die zu verminderter Vasorelaxation und nachfolgend zu erhöhtem Blutdruck führt (Brenner *et al.*, 2000b; Pluger *et al.*, 2000). Der genaue Mechanismus ist ungeklärt; neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass in diesen Mäusen eine erhöhte Vasokonstriktion der renalen Arteriolen zu einer vermehrten Reninausschüttung und damit zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems führt, die eine Blutdrucksteigerung zur Folge hat (O. Pongs,

³ In *Drosophila* wurden darüber hinaus mit dSLIP1 (Xia *et al.*, 1998) und Slob (Jaramillo *et al.*, 2004; Schopperle *et al.*, 1998) zwei Proteine identifiziert, die mit dem slo1-Carboxyterminus interagieren und möglicherweise am Membrantransport beteiligt sind.

⁴ Interessant ist, dass diese akzessorischen Elemente nicht in *Drosophila melanogaster* oder *C.elegans* beschrieben wurden, es sich hierbei also möglicherweise um eine in der Evolution relativ neue Proteinklasse handelt.

pers. Mitteilung). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in männlichen Ratten, die durch Dauerinfusion von Angiotensin II einen essentiellen Bluthochdruck entwickeln, unter anderem die β_1 - aber nicht die α -Untereinheit herunterreguliert wird (Amberg *et al.*, 2003).

Nicht zuletzt bewirkt das β_1 -Protein die Spezifität für die Aktivierung durch bestimmte MaxiK-Öffner. So ist die Anwesenheit der Hilfsuntereinheit essentiell für die interzelluläre Bindung des Dehydrosaponins (McManus *et al.*, 1995; Giangiacomo *et al.*, 1998) und die externe Bindung des 17β -Estradiols (Valverde *et al.*, 1999; Dick & Sanders, 2001). Auch die hohe Affinität des Kanalkomplexes für den MaxiK-Blocker Charybdotoxin wird durch das β_1 -Protein bedingt und ist bei allen anderen β -Varianten herabgesetzt (Giangiacomo *et al.*, 2000).

Das β_2 -Protein existiert neuronal und in chromaffinen Zellen; Koexpression mit dem α -Protein führt dazu, dass der Kanal schneller inaktiviert (Xia *et al.*, 1999). Dieser Effekt wird auch im Zusammenhang mit der β_3 -Untereinheit (Brenner *et al.*, 2000a) beobachtet. β_4 wird ausschließlich neuronal exprimiert (Brenner *et al.*, 2000a), verlangsamt die Aktivierung und beschleunigt die Inaktivierung des MaxiK Kanals.

Aufgrund seiner stark repolarisierenden Eigenschaften wird die Aktivität des MaxiK Kanals durch intrazelluläre Signalwege strikt kontrolliert. An dieser Stelle sei nur kurz die glattmuskuläre Regulation beschrieben: Sowohl die Proteinkinasen PKG und PKA als auch PKC modulieren MaxiK. Damit wirken die zentralen Signalkaskaden cGMP, cAMP und IP_3 (siehe Abb.1) direkt auf den Kanal ein. PKA (Sadoshima *et al.*, 1988) und PKG (Taniguchi *et al.*, 1993) aktivieren, indem sie die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals erhöhen, ohne dass sich die Einzelkanalleitfähigkeit und die Potentialabhängigkeit ändert. Wahrscheinlich beruht dies auf einer erhöhten Sensitivität gegenüber Ca^{2+} . Demgegenüber inhibiert PKC MaxiK-vermittelte Kaliumströme (Minami *et al.*, 1993). Die jeweiligen Mechanismen der Regulation sind noch nicht vollständig geklärt; PKA und PKG phosphorylieren den Kanal an Serinen nahe dem 3'-Ende des MaxiK- α -Proteins (Tian *et al.*, 1998; Alioua *et al.*, 1995). Beide Phosphorylierungen stehen anscheinend unter der Kontrolle der PKC, die benachbarte Serine phosphoryliert und dadurch die Phosphorylierung durch PKA und PKG verhindert (Zhou *et al.*, 2001). Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass andere Proteine zwischengeschaltet sind. Auf diese Weise kann der MaxiK Kanal die Modulation verschiedener Signalkaskaden integrieren.

Das MaxiK- α -Transkript unterliegt einem extensiven Spleißen, durch welches Isoformen gebildet werden, die sich bezüglich Kalzium- und Spannungssensitivität (Lagrutta *et al.*, 1994), Regulation durch posttranslationale Modifikation (Tian *et al.*, 2001) sowie dem Kanaltransport zur Membran unterscheiden (Wang *et al.*, 2003; Zarei *et al.*, 2001). Neben dem Amino-terminus ist es vor allem der Carboxyterminus, in dem diese Sequenzabweichungen vorlie-

gen. Aufgrund der hohen Dichte an Spleißstellen in diesem Abschnitt wäre es möglich, dass bis zu 200 Isoformen des MaxiK Kanals existieren könnten (Korovkina *et al.*, 2001). Die molekularen Mechanismen, die zum Spleißen des Kanals führen, sind bislang weitgehend ungeklärt.

Bestimmte Spleißisoformen werden gewebe-spezifisch exprimiert (Iverson *et al.*, 1997); es existieren aber auch Regionen, in denen eine Häufung oder sogar ein Gradient an verschiedenen MaxiK- α -Isoformen auftritt⁵ (Fettiplace & Fuchs, 1999; Ramanathan *et al.*, 1999). Zudem bilden auch externe Signale wie das adrenocorticotrophische Hormon (ACTH) einen Stress-Stimulus, der die Bildung alternativ gespleißter MaxiK-Isoformen in Neurohypophysenzellen zur Folge hat (Xie & McCobb, 1998). Obwohl die meisten Isoformen im auditorischen und neuronalen System detektiert wurden, existiert zumindest eine Isoform in Glattmuskelzellen humaner Koronararterien, die eine carboxyterminale 132bp-Insertion im Vergleich zum Wildtyp aufweist (Korovkina *et al.*, 2001).

Die Transportmechanismen, die MaxiK Kanäle aus dem endoplasmatischen Retikulum an die Zelloberfläche führen, sind bislang noch nicht geklärt. Lediglich in *Drosophila* wurden bislang Proteine identifiziert, die daran partizipieren (siehe Fußnote 3). Dennoch scheint dies einen weiteren Regulationsmechanismus der MaxiK-Expression darzustellen, da in vaskulären Glattmuskeln spontan hypertensiver Ratten (SHR-Modell) zwar keine Erhöhung des MaxiK- α -Transkripts, aber eine Zunahme von MaxiK-Protein in der Plasmamembran ermittelt werden konnte (Liu *et al.*, 1997; Cox, 2002).

1.5 Der MaxiK Kanal als Zielstruktur für die Entwicklung neuer Antihypertensiva

Kaliumkanaldysfunktionen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese vaskulärer Erkrankungen und ihrer Folgeschäden, wie z.B. Bluthochdruck und Hypoxie (England *et al.*, 1993; Peng *et al.*, 1999). Generell wäre es wünschenswert, den Tonus der Glattmuskelzelle therapeutisch zu senken und so den peripheren Widerstand und damit den systemischen Blutdruck zu senken. Darüber hinaus können so zytotoxische Effekte, die durch die vaskuläre Hypererregbarkeit entstehen, eingeschränkt werden (Weiger *et al.*, 2002). Ein Ansatzpunkt ist daher, die Erregbarkeit der Plasmamembran und den Kalziumeinstrom in glattmuskuläre Zellen zu verringern. Dies wird durch eine Erhöhung der Kaliumpermeabilität erreicht, und Kaliumkanal-Agonisten stellen daher neue potentielle Antihypertensiva dar.

⁵So erfolgt die Feinregulation der Aktionspotentialpropagation in Haarzellen der Cochlea des Huhns über mindestens elf verschiedene Isoformen des MaxiK (Navaratnam *et al.*, 1997).

Der vaskuläre MaxiK Kanal Komplex bildet in diesem Zusammenhang eine vielversprechende Zielstruktur. Wie in Abschnitt 1.3 und 1.4 erwähnt ist er

- krankheitsrelevant, da in hypertensiven Ratten die Aktivität des Proteins hochreguliert wird und sowohl in MaxiK α - als auch β_1 -/-Mäusen ein essentieller Bluthochdruck nachgewiesen wurde.
- gewebespezifisch, da die β_1 -Untereinheit außer in Gefäßen nur im Hirn detektiert werden konnte, so dass mit der Entwicklung nichthirngängiger Agonisten die Gefahr von Nebenwirkungen eingeschränkt wäre.
- aktivierbar, wie für eine Vielzahl von Öffnern gezeigt. Darüber hinaus ist der vaskuläre α - β_1 -Kanal durch DHS oder β -Estradiol selektiv stimulierbar, was bedeutet, dass sich der Proteinkomplex strukturell von anderen MaxiK Kanälen unterscheidet.

MaxiK-Aktivatoren wurden und werden daher neben einer Anwendung als Antihypertensiva für eine Reihe von Indikationen wie zum Beispiel Asthma (Rogers, 1996), Schlaganfall und Traumata (Gribkoff *et al.*, 2001a), Inkontinenz (Meredith *et al.*, 2004) sowie erektiler Dysfunktion (Gragasin *et al.*, 2004) entwickelt.

Die ersten niedermolekularen MaxiK-Aktivatoren, die durch die Firma Neurosearch in den neunziger Jahren entdeckt wurden, gehören zur Gruppe der Arylbenzimidazolone (Olesen, 1992), wurden als Aktivatoren der α -Untereinheit identifiziert und in neuronalen, glattmuskulären und endokrinen Zellen bestätigt (Kaczorowski & Garcia, 1999). Als postulierter Aktivierungsmechanismus wird in allen Fällen eine dem Kalzium entsprechende Wirkung beschrieben, indem es zu einer Verschiebung der IV-Kurve zu negativeren Potentialen hin kommt. Der bekannteste Vertreter dieser Substanzklasse ist NS1619. NeuroSearch beschrieb, dass diese Substanz spezifisch MaxiK-induzierte Kaliumströme potenziert (Olesen *et al.*, 1994a; Olesen *et al.*, 1994b), auch wenn dies in der Literatur angezweifelt wird (Patel *et al.*, 1998). Mangels Wirksamkeit wurde die klinische Entwicklung jedoch nicht durchgeführt.

Ciba-Geigy modifizierte diese Grundstruktur weiter, indem sie mit CGS7181 einen N-aryl-N'-indolyl-Harnstoff entwickelten (Hu *et al.*, 1997); die Arbeiten an dieser Substanz wurde nach der Fusion zu Novartis 1997 jedoch aufgegeben.

Bristol-Meyer-Squibb entwickelte mit Flindokalner (BMS-204352), (Gribkoff *et al.*, 2001b) einen strukturverwandten MaxiK-Agonisten für die Indikation zerebralkuläre Ischämie und Schlaganfall. Die Phase III-Studie POST-010 MRI, bei der 1mg im Falle eines akuten Hirninfarkts zur Verringerung des ischämischen Läsionsvolumens gegeben wurde, erbrachte aber keine signifikante Verbesserung des Krankheitsbildes gegenüber der Placebogruppe (Warrach *et al.*, 2002).

Aus der Gruppe der Naturstoffe mit MaxiK-aktivierenden Eigenschaften seien an dieser Stelle neben dem α,β_1 -spezifischen Dehydrosoyasaponin (McManus *et al.*, 1993) einige Substanzen erwähnt, die nur auf die α -Untereinheit wirken. Vinpocetin, ein Derivat des Vincamins, stimuliert MaxiK-vermittelte Ströme in der Adenohypophysen-Zelllinie GH₃ (Wu *et al.*, 2001); allerdings greift es durch Inhibition der cGMP-Phosphodiesterase auch in den cGMP-Signalweg ein, was letztlich in einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration resultiert. Ebenso erhöht Resveratrol, ein Phytoalexin, welches im Wein vorkommt, und dem eine direkte Aktivierung auf MaxiK Kanäle in Endothelzellen nachgewiesen wurde (Li *et al.*, 2000), den intrazellulären cGMP-Spiegel (Fitzpatrick *et al.*, 1993). MaxiKdiol, ein schwacher MaxiK Kanal-Öffner, der von Merck aus dem Fermentationsgemisch eines unbekanntes Coelomyziten isoliert wurde, aktiviert MaxiK Kanäle in isolierten Glattmuskelzellen aus Schweine-Koronararterien nur von der intrazellulären Seite aus (Singh, 1994; Kaczorowski, 1999). Yuji Imaizumi und Kollegen identifizierten weitere Naturstoffe und Derivate, deren Grundstrukturen der des MaxiKdiols entsprechen, aber erhöhte Aktivitäten zeigten. Dehydroabietinsäurederivate (Ohwada *et al.*, 2003) wiesen ein breites Spektrum an Aktivatoren auf. Die verwandte Struktur Pimarinsäure, ein Terpenoid des Pinienharzes, führte ab einer Konzentration von 1 μ M zu einer Erhöhung der MaxiK-vermittelten Ströme in transfizierten HEK293-Zellen (Imaizumi *et al.*, 2002) und bildet den potentesten Vertreter in dieser Substanzklasse.

Allen letztgenannten Substanzen ist gemeinsam, dass sie auf das Homomultimer aus α -Proteinen wirken und daher über keine oder geringe Gewebespezifität verfügen. Darüber hinaus wurden für einige der beschriebenen Aktivatoren unspezifische Effekte auf andere K⁺ Kanäle sowie Ionophoreigenschaften beschrieben (Edwards *et al.*, 1994; Yamamura *et al.*, 2001). Insofern ist es nicht erstaunlich, dass keine dieser Substanzen auf den Markt gelangte. Der hier vorgestellte Ansatz ist daher auf die Entwicklung gewebespezifischer Substanzen, die keine unerwünschten Nebeneffekte aufweisen, fokussiert.

1.6 Fragestellung

Der MaxiK Kanal stellt eine entscheidende Komponente der Signaltransduktion der Glattmuskelzelle dar. Zahlreiche Studien belegen, dass die Aktivierung des MaxiK Kanals zu einer Vasodilatation *in vitro* und *in vivo* führt. Synthetische MaxiK-Agonisten stellen daher mögliche neue Antihypertensiva dar. In der Vergangenheit entwickelte Aktivatoren konnten jedoch aufgrund ihrer fehlenden Selektivität, unerwünschter Nebenwirkungen sowie unzureichender pharmakokinetischer Eigenschaften nicht zur Marktreife gebracht werden.

Um mit einem molekularen und Hochdurchsatzscreening-fähigen Ansatz neue Aktivatorstrukturen mit einer Selektivität für den vaskulären MaxiK Kanal zu identifizieren, wurde ein

zelluläres Testsystem durch Koexpression von ionenleitender MaxiK α - und modulatorischer β_1 -Untereinheit etabliert. Bekannte Agonisten wurden dann in diesem Testsystem pharmakologisch charakterisiert. Im einzelnen wurden folgende Aufgabenstellungen bearbeitet:

1. Validierung der $\alpha+\beta_1$ -MaxiK-Zielstruktur durch

- Funktionsanalyse heterolog exprimierter $\alpha+\beta_1$ -Kanäle in Säugetierzellen und
- Nachweis der funktionellen Interaktion von α - und β_1 -Untereinheiten mittels elektrophysiologischer Techniken wie Ganzzell- und inside-out-Patch-Clamp Ableitungen.
- Pharmakologische Charakterisierung bekannter Agonisten im Testsystem durch
 - elektrophysiologische Techniken und
 - bildgebende ratiometrische Fluoreszenzuntersuchungen

Im Rahmen der Klonierung der MaxiK- α -Untereinheit wurden von Aventis-Mitarbeitern aus einer Herz-cDNS-Bibliothek neben der bekannten cDNS auch eine neue Variante mit einer bisher unbekanntem Spleiß-Deletion im Carboxyterminus identifiziert. Da Herzmuskelzellen jedoch keine funktionelle MaxiK-Expression aufweisen, stellte sich die Frage, ob neben der bekannten auch die neu identifizierte α -Untereinheit vaskuläre oder möglicherweise kardiale MaxiK Kanäle ausbildet, und was die Funktion dieser Spleiß-Deletion sei.

2. Das neu identifizierte α -Protein wurde daher wie folgt charakterisiert:

- Gewebeexpressionsverteilung durch
 - PCR-Analysen von Gewebe-cDNS-Banken
- funktionelle Expression in transient transfizierten HEK293-Zellen bzw. *Xenopus laevis* Oozyten zum Zwecke
 - elektrophysiologischer Analysen und
 - immunzytochemischer Untersuchungen
- Assemblierungsverhalten in transient transfizierten HEK293-Zellen und *Xenopus laevis* Oozyten bezüglich der
 - Heteromerisierung mit α -Wildtyp bzw. β_1 -Proteinen
 - Homomerisierung
- Retentionsregulation in transient transfizierten HEK293-Zellen per Mutationsanalyse
- subzelluläre Lokalisation in transient transfizierten HEK293-Zellen
- Expression in Zelltyp-Analoga des Blutgefäßes wie
 - Primärkulturen glatter Muskelzellen aus Ratte
 - der humanen Endothelzelllinie EAhy926

2 Material und Methoden

Die Herstellernamen sind den Reagenzien in Klammern beigefügt.

Feinchemikalien wurden von Merck (Darmstadt) und Sigma Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.1 Molekularbiologische Methoden

Zur Generierung der für die Funktionsanalyse benötigten Plasmidkonstrukte, zur Untersuchung der Gewebeexpression sowie für die Synthese der cRNS wurden die in diesem Kapitel aufgeführten molekularbiologischen Standardprotokolle (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet. Die Aufzählung folgt dabei einem gängigen Schema und nicht einer chronologischen Reihenfolge.

2.1.1 Genetische Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli*-Bakterien (DH5aF', Invitrogen, Karlsruhe) wurden auf Eis aufgetaut, je 40µl in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß pipettiert und mit 10-100ng Plasmid-DNS bzw. 1-3µl eines Ligationsmixes (siehe 2.1.5.2) durch Pipettieren gemischt. Nach Inkubation von 30min auf Eis, währenddessen Plasmid-DNS und *E. coli* -Zellwand ein lockeres Aggregat bilden, wurde die Transformation durchgeführt (s.u.). Durch Zugabe von 1ml SOC-Medium (siehe 2.1.8) und Inkubation bei 37°C mit 250Upm für 1h auf dem Inkubator-Schüttler Certomat® HK (B.Braun, Melsungen) wurden die überlebenden Bakterien vermehrt. Anschließend wurden 150µl der Zellsuspension auf LB-Agarplatten (siehe 2.1.8), die Ampicillin oder Kanamycin (Sigma, Taufkirchen) in einer finalen Konzentration von 100µg/ml enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die transformierten Zellen wurden während des nächtlichen Wachstums anhand der plasmidkodierten Antibiotikaresistenz selektioniert.

Zur Transformation wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet:

Im Falle von Plasmid-DNS wurde das schnelle und unkomplizierte Hitzeschock-Verfahren verwendet. Dabei werden die Zellen für exakt 40s von 4°C auf 42°C in ein Wasserbad überführt. Durch die Temperaturänderung werden die Bakterienzellwände kurzfristig permeabel, so dass die Plasmid-DNS in die Zellen gelangen kann. Anschließend wird die Suspension für 5min auf 4°C belassen, um eine Relaxation der Bakterien zu ermöglichen.

Zur Transfektion von Ligationsansätzen wurde die effektivere Transformation mittels Elektroporation angewandt. Die Bakterien werden dabei kurzfristig einem Stromstoß ausgesetzt, der Löcher in der Membranwand generiert, durch die DNS aufgenommen wird. Dabei muss berücksichtigt werden, dass nur entsprechend gekennzeichnete Bakterien verwendet werden können. Zu diesem Zwecke wurde ein BioRad GenePulser (BioRad, München) verwendet. 40µl elektrokompenter Zellen wurden in eine vorgekühlte Plastikvrette des Geräteherstel-

lers pipettiert und diese zwischen den Elektroden befestigt. Durch Anlegen einer Spannung von 2kV wurde bei einem mittleren Widerstand von 400Ω und einer Kapazität der Kondensatorelektroden von 20μF ein Strompuls ausgelöst. Anschließend wurde sofort 1ml SOC-Medium zugegeben und die Suspension in den Schüttler überführt.

2.1.2 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

2.1.2.1 Präparative Plasmid-DNS-Isolierung aus E. coli-LB-Medien

Präparative Plasmidisolierungen wurden mit dem Qiagen Midi bzw. Maxi Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Die Identität und Reinheit des Plasmids wurde durch Restriktionsanalyse (siehe 2.1.5.1) sowie Agarosegelelektrophorese (siehe 2.1.3.1) überprüft und die Konzentration der Plasmid-DNS bei 260nm spektrophotometrisch bestimmt.

Zur analytischen Plasmid-DNS-Isolierung wurden 2ml einer Übernachtskultur von *E. coli* gemäß dem Protokoll des QIAspin Miniprep Kit™ (Qiagen, Hilden) verarbeitet.

Die Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen (siehe 2.1.3.1) und aus Lösungen erfolgte unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit™ (Qiagen, Hilden).

2.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Aufgrund ihrer negativen Überschussladung wandern Nukleinsäuren im elektrischen Feld zur Anode. Da die chemischen Unterschiede zwischen Nukleinsäuren eher gering sind, hängt die Wanderungsgeschwindigkeit in einem Gelsieb in erster Linie von der Molekülgröße ab, so dass kleinere Moleküle schneller durch das Gel wandern. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid zwischen die Basen der Nukleinsäuren und nachfolgendem Elektronentransfer erscheint der entstandene Komplex nach Anregung mit UV-Licht im sichtbaren Bereich als rot-orange leuchtende Bande, ohne dass sich das Laufverhalten ändert.

2.1.3.1 DNS-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNS-Fragmente erfolgte in 1-2%(w/v)-igen Agarosegelen. Die dazu benötigte Menge Agarose (Seakem, Rockland, USA) wurde im Gelpuffer 1xTAE suspendiert und durch kurzzeitiges Erhitzen in der Mikrowelle (für 100ml: 2min bei 600W) gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 70°C wurde Ethidiumbromid (Biorad, München) in der finalen Konzentration 0,1μg/ml hinzugefügt und die Lösung in eine vorbereitete Gelhalterung gegossen.

0,1-1μg der zu untersuchenden DNS-Fragmente wurden mit 2μl Loading Buffer (BioRad, München) ad 10μl mit H₂O angesetzt (bei größeren Mengen entsprechende Vielfache).

Nach dem Erkalten des Gels erfolgte die elektrophoretische Trennung bei Raumtemperatur in einer horizontalen Kammer mit 120V. Fluoreszierende DNS-Banden konnten durch Auflegen auf einen UV-Strahler (Transilluminator, Biometra, Göttingen) mit Hilfe einer Videokame-

ra (Intas, Göttingen) photographiert werden. Zur Ermittlung größerer Fragmente wurde eine 1kB Leiter (Invitrogen, Karlsruhe), zur Ermittlung kleiner Fragmente der Molekulargewichtsmarker 100bp-ladderTM (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

2.1.3.2 Denaturierende RNS-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Ribonukleinsäuren erfolgte in 1,2% (w/v)-igen Agarosegelen unter denaturierenden Bedingungen, um die gegenüber DNS-Molekülen weitaus stabileren RNS-Sekundärstrukturen, die zu einem größenunabhängigen Laufverhalten führen, zu eliminieren. Der Gelpuffer wurde folgendermaßen angesetzt:

RNS-Gelpuffer (ad 50ml):

10ml 37%(v/v) Formaldehyd (Sigma Aldrich, Taufkirchen)

5ml MOPS10x-Laufpuffer, pH7,0

35ml DEPC-behandeltes H₂O

12µl eines Denaturierungspuffers wurden zu ca. 0,5-1µg RNS und 1µl Ethidiumbromid (Stammlösung 5mg/ml) gegeben und für 5min auf 65°C erhitzt. Da Ethidiumbromid wesentlich schlechter in Einzelstrang-Nukleinsäuren interkaliert, wurde der Farbstoff direkt zur Probe hinzugegeben. Der Denaturierungspuffer war folgendermaßen zusammengesetzt:

Denaturierungspuffer (ad 90µl):

60µl Formamid (Sigma Aldrich, Taufkirchen)

20µl Formaldehyd

10µl MOPS 10x-Laufpuffer

Die Probe wurde für 10min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 3µl des Auftragepuffers für RNS (Invitrogen Life Sciences, Karlsruhe) wurde das Gemisch in einer horizontalen Gelkammer bei 90V elektrophoretisch getrennt. Als Größenstandard für die RNS-Elektrophorese wurde eine RNS Leiter (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

2.1.4 Detektion und Identifizierung von Nukleinsäuren

2.1.4.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Ein Nukleinsäurealiquot wurde 1:100 in H₂O verdünnt und die Absorption der Probe gegen das Lösungsmittel bei 260nm bzw. 280nm Wellenlänge (OD₂₆₀ bzw. OD₂₈₀) am Eppendorf Bio-Photometer bestimmt (Eppendorf, Hamburg). Die Konzentration der Probe wurde aus der Absorption bei 260nm berechnet:

$c \text{ in g/l} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times \text{Faktor}$ (50 für Plasmide, 40 für RNS, 20 für Oligonukleotide).

Der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ ist ein Maß für die Reinheit der Probe; Werte zwischen 1,6 und 1,8 (DNS) bzw. 1,8 und 2 (RNS) wurden als rein angesehen.

2.1.4.2 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der firmeninternen Abteilung Functional Genomics in Frankfurt auf einem ABI 3100-16 capillary system (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Darmstadt) mit Hilfe des ABI Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt.

2.1.5 Modifikation von Nukleinsäuren

2.1.5.1 Spaltung von DNS mit DNS-Restriktionsendonukleasen

Für die Spaltung von DNS wurden käufliche Restriktionsendonukleasen und die dazugehörigen Reaktionspuffer eingesetzt. Die Reaktionen wurden nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

Analytischer Verdau. Es wurden 0,3-1µg Plasmid-DNS in einem Volumen von 10µl 90min bei 37°C gespalten. Die eingesetzte Enzymmenge betrug 2-5U pro µg eingesetzter DNS.

Präparativer Verdau. Es wurden 5-10µg Plasmid-DNS in einem Volumen gespalten, in dem die zugesetzte Enzymlösung 10% nicht überstieg. Der Verdau wurde in Gegenwart von 1-2U pro µg eingesetzter Plasmid-DNS über einen Zeitraum von mindestens 8h durchgeführt.

2.1.5.2 Ligation von DNS

Zur Insertion eines DNS-Fragmentes in ein zuvor linearisiertes Plasmid wurde die DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 (Roche Biochemicals, Mannheim) verwendet. Dazu wurden 30ng der Vektor-DNS mit 20ng des einzubringenden DNS-Fragmentes bzw. in einigen Fällen die dreifache Menge an Vektor- und Fremd-DNS eingesetzt. Die DNS wurde in einem Volumen von 10µl mit 2U T4 DNS-Ligase und dem Ligationspuffer des Herstellers über Nacht bei 16°C inkubiert. 2-4µl des Reaktionsgemisches wurden direkt zur Transformation von kompetenten *E. coli*-Bakterien eingesetzt.

2.1.5.3 cRNS-Synthese

Die linearisierte DNA wurde mit Hilfe des RNS-Synthese Kits mMessageMachine™, Ambion T7 (Ambion Europe, Huntingdon, UK) hergestellt. Dabei wurden die üblichen Vorsichtsmaßnahmen wie das Tragen von Handschuhen, und das Arbeiten mit RNase freien Gebrauchsmaterialien an einer RNase freien Arbeitsfläche getroffen.

Reaktionsansatz *in vitro*-Transkription:

2µl Transkriptionspuffer 10x

10µl Ribonukleotid-Mix 2x

1µg linearisierte DNS

2µl 10fach Enzym-Mix (jeweils spezifisch für SP6 und T7)

Das Reaktionsgemisch wurde bei RT mit einer Pipettenspitze durchmischt und 2h bei 37°C inkubiert. Nach zwei Stunden wurde pro Ansatz 1µl DNase zugegeben und weitere 15min bei 37°C inkubiert, um die DNS-Matrize zu zerstören. Schließlich folgte die Zugabe von 30µl DEPC Wasser und 25µl Lithiumchlorid als Fällungsreagenz. Nach einem Durchmischen folgte eine 30minütige Lagerung bei –20°C. Anschließend wurde bei 4°C und 13000rpm in einer Zentrifuge für 15min zentrifugiert. Durch Abnehmen des Überstandes wurde am Rand des Eppendorf-Cups ein weißes Pellet sichtbar, welches mit 1ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20µl DEPC-Wasser aufgenommen wurde.

Nach einer entsprechenden Wartezeit, um die Resuspension der RNS im Wasser zu vervollständigen, wurde der RNS-Gehalt photometrisch bestimmt, und, um die Authentizität der synthetisierten RNS zu gewährleisten, eine Gelelektrophorese mit einer Referenzsubstanz bzw. Größenmarker durchgeführt (siehe 2.1.3.2).

2.1.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Allgemein. Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion besteht in einer zyklischen *in vitro* Replikation definierter DNS-Abschnitte durch DNA-Polymerasen. Über die Reaktionstemperatur wird dabei DNS-Dissoziation, -Assoziation und –Elongation gesteuert. Das Amplifikationspotential wird durch zwei Modifikationen entscheidend erhöht: Durch die Verwendung hitzestabiler DNS-Polymerasen aus Archaeobakterien (Saiki *et al.*, 1988) (z.B. *Taq*-DNS-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) muss das Enzym nicht regeneriert werden, so dass im automatisierten Prozess die DNS-Replikation mehrfach wiederholt werden kann. Anstatt einem Oligonukleotid werden zwei verwendet, die jeweils zu einem der beiden Doppelstränge komplementär sind und gemeinsam den zu amplifizierenden Bereich einrahmen („Primer“). Somit können bei jeder Replikation aus einer doppelsträngigen DNS zwei neue Tochterstränge entstehen, was in einer exponentiellen Amplifikation resultiert.

Oligonukleotiddesign. Die verwendeten Oligonukleotide sind in 2.1.7 aufgeführt.

Interne Kontrollen. Interne PCR-Kontrollen ermöglichen einen groben Vergleich der zu amplifizierenden Nukleinsäuremenge und –qualität. Als interner Standard wurde die Amplifikation eines 983bp-Produktes der Glukosealdehydphosphat-dehydrogenase (GAPDH)-cDNS mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Oligonukleotidpaares (Clontech BD, Heidelberg) verwendet. Dieses Enzym der Glykolyse wird in allen Zellen in relativ geringer Zahl konstitutiv exprimiert, so dass die transkribierte cDNS ein Maß für die Menge an intakter Gesamt-RNS darstellt.

2.1.6.1 Analytische PCR-Amplifikation

Zum analytischen Nachweis von cDNS-Fragmenten wurde das folgende, für die *Platinum* DNA *Taq*-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) optimierte Standardprotokoll durchgeführt.

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Vorsichtsmaßnahmen, die für RNS-Techniken gelten, auch bei der Polymerase-Ketten-Reaktion angewandt. Alle Schritte wurden auf Eis unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Zum Ansatz wurden ein (GAPDH-Primer) bzw. 3 drei μl (MaxiK-Oligonukleotide) der jeweiligen cDNS gegeben.

Ein 50 μl -Ansatz enthielt folgende Komponenten:

PCR-Reaktionsansatz :

5 μl PCR RxN 10x-Puffer (Invitrogen , Karlsruhe)
1,5 μl 50mM MgCl_2 (Invitrogen, Karlsruhe)
1 μl Vorwärts-Oligonuk. (10 μM , siehe 2.1.7)
1 μl Revers-Oligonuk. (10 μM , siehe 2.1.7)
4 μl dNTP (2,5 mM) (Invitrogen, Karlsruhe)
5U PlatinumTaq-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe)
1-3 μl cDNS-Probe (BD, Heidelberg)
ad 50 μl DEPC-behandeltes H_2O

Zyklusparameter:

Initiale Denaturierungsphase (96 $^{\circ}\text{C}$, 2min)
Denaturierung (96 $^{\circ}\text{C}$, 30s)
Annealing (60 $^{\circ}\text{C}$, 60s)
Extension (72 $^{\circ}\text{C}$, 60s)
Wiederholung der Schritte 2 bis 4 (insgesamt 33 Zyklen)
Abschließende Extension (72 $^{\circ}\text{C}$, 10min)

Die Ansätze wurden in dünnwandigen PCR-Gefäßen (Geneamp™, Perkin-Elmer, Weiterstedt) direkt aus dem Eis in den auf 94 $^{\circ}\text{C}$ vorgeheizten Biometra Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen) überführt. Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Produkte bei – 20 $^{\circ}\text{C}$ oder 4 $^{\circ}\text{C}$ gelagert; 5-10 μl wurden per Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

2.1.6.2 Präparative PCR-Amplifikation

Für die präparative Synthese von cDNS-Fragmenten zur Herstellung von Plasmidkonstrukten für die Struktur-Funktionsanalyse wurde eine *Pfu*-Polymerase mitsamt dem zugehörigen Puffer (Invitrogen Life sciences, Karlsruhe) in einem Reaktionsansatz entsprechend 2.1.6.1 eingesetzt. Dieses Enzym besitzt eine 3`-5`-Exonukleaseaktivität, wodurch sich die Sequenzgenauigkeit erhöht.

100ng der Matrizen-DNS wurden zum Reaktionsansatz gegeben; die PCR wurde mit den Standardzyklusparametern für 32 Zyklen durchgeführt und anschließend vollständig gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.1.7 Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide wurden von der Firma Qiagen Operon GmbH, Köln bezogen.

Gen	+/-	Sequenz
MaxiK α	forward	MaxiK 1F (nt 1934) 5`-AAG ACA CAT GGC AGA AAT ACT A-3`
	reverse	MaxiK 1R (nt 2452) 5`-AGT GAA ACA TCC CAG TAG AGT C-3`
MaxiK α	forward	MaxiK 3F (nt 2018) 5`-CTT CCC TAC TGT TTG TGA GCT-3`
	forward	MaxiK 4F (nt 2018) 5`-CTT CCC TAC TGT TTG TGA TAT-3`
	reverse	MaxiK 2R (nt 2227) 5`-GGA TCT GTG ATG TCA TCA TGA C-3`
G3PDH	forward	ohne Angaben
	reverse	ohne Angaben

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Analyse-Oligonukleotidpaare. Die verwendeten Oligonukleotidpaare der RT-PCR-Analyse sind jeweils in Sense- oder Antisense-Orientierung in 5`→3`-Richtung als Vorwärts (forward) oder Rückwärts (reverse)-Oligonukleotid angegeben und nummeriert. Die Positionen des jeweils ersten Nukleotids in der Primärsequenz der entsprechenden cDNS (Accession Nummer in GenBank (NCBI, Bethesda, USA) für MaxiK- α : NM_002247) sind in Klammern dargestellt. Im Falle der MaxiK α -cDNS wurden die Oligonukleotidprimer 3F und 4F flankierend zu den variablen Bereichen der Spleißinsertion angepasst (siehe Ergebnisteil). Über die verwendeten Kontrollprimer zur Amplifikation eines 893 bp-Produktes der G3PDH-cDNS liegen keine Angaben seitens des Herstellers (Clontech BD, Heidelberg) vor.

Name	+/-	Position des 5`-Nukleotids und Sequenz
(MaxiK)OutF	forward	(nt 2355) 5`-GCT GAT GAG GCA TGA CCC CTT GTT A-3`
(MaxiK)AAAR	reverse	(nt 3435) 5`-TGA GCA TCT <u>GCC</u> <u>GCC</u> <u>GCG</u> TAA ATT C-3`
(MaxiK)AAAF	forward	(nt 3410) 5`-GAA TTT AC <u>G</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> <u>CAG</u> ATG CTC A-3`
CL29	reverse	5`-GCT TAG AGA CTC CAT TCG-3`

Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Synthese-Oligonukleotidpaares. Zur Nomenklatur und Accession Nummer, siehe Tab.2. Die gegenüber der Primärsequenz veränderten Nukleotide sind unterstrichen dargestellt. Die Hybridisierungsstelle für CL29 liegt auf dem pSGEM-Vektor im 3`-Bereich hinter der Klonierungskassette.

2.1.8 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

<u>DEPC-H₂O</u> :	H ₂ O (MilliQ, Millipore, Molsheim) mit 0,01%(v/v) Diethylpyrocarbonat (Sigma Aldrich, Taufkirchen) versetzen, die Lösung über Nacht unterm Abzug aufbewahren und am nächsten Tag autoklavieren
<u>LB</u> :	10g Bacto-Trypton (Difco, Hamburg) 5g Bacto-yeast-extract (Difco, Hamburg) 10g NaCl
<u>PBS</u> :	136mM NaCl 3,67mM KCl 9mM Na ₂ HPO ₄ 1,7mM KHPO ₄ , pH7,4
<u>SOB</u> :	20g Bacto-Trypton 5g Bacto-yeast-extract 0,5g NaCl
<u>SOC</u> :	SOB (s.o.) + 20mM Glukose (Sigma, Taufkirchen)
<u>TAE</u> :	0,04M Tris-Acetat 0,001M EDTA
<u>TE</u> :	10mM Tris-HCl, pH8,0 0,1mM EDTA

2.2 Kultivierung von Säugetierzellen

Um jegliche Kontamination der Säugetierzellen zu vermeiden wurden alle Arbeiten unter der sterilen Werkbank Herasafe® mit laminaren Luftstrom (Heraeus, Hanau) durchgeführt. Weiterhin wurden zuvor mit Sterilium desinfizierte Handschuhe und saubere Laborkittel benutzt. Alle Pipetten und Spitzen wurden als Verbrauchsmaterialien nur einmal verwendet und dann entsorgt. Medien und Behältnisse, die Zellen enthielten, wurden separat gesammelt und vor der Entsorgung autoklaviert.

2.2.1 Verwendete Säugetierzelllinien

EAh926

EAh926-Zellen wurden als Hybridom-Zelllinie aus der Fusion von Endothelzellen der Nabelschnur und Lungentumorzellen entwickelt (Edgell *et al.*, 1983) und werden in der Zellbiologie aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten mit Endothelzellen verwendet. Die Kultivierung der Zelllinie wurde freundlicherweise von Frau Dr. Eveline Schaad durchgeföhrt.

Kultivierungsmedium:

IMDM (Gibco Invitrogen, Karlsruhe)

10%(v/v) FCS (BD GmbH, Heidelberg)

1%(v/v) Penicillin-Streptomycin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

2mM Glutamin (200mM) (Invitrogen, Karlsruhe)

2,5ml Biotect

10ml HAT Supplement 50x

CHO

CHO-Zellen (chinese hamster ovary cells) sind ein gebräuchliches Zellsystem, in welchem die Expression von Kanalproteinen durchgeführt wird. Die Zellen besitzen nur eine geringe Anzahl endogener Ionenkanäle.

Kultivierungsmedium:

DMEM mit Glutamax1 (Gibco Invitrogen, Karlsruhe)

10%(v/v) FCS (BD, Heidelberg)

HEK 293 Flp-In

HEK-293-Zellen (human embryonic kidney cells) werden ebenfalls als Expressionssystem für membranständige Proteine verwendet. Die Ionenkanalpopulation der HEK293-Wildtypzelle ist dokumentiert (T. Licher, pers. Mitteilung).

Kultivierungsmedium:

DMEM mit Glutamax1 (Gibco Invitrogen, Karlsruhe)

10%(v/v) FCS (BD, Heidelberg)

0,1%(v/v) Zeocin (Invitrogen, Karlsruhe)

2.2.2 Expressionsregulierte Zelllinien: Das TRex-System

Die rekombinante Proteinexpression in Säugerzellen zu regulieren ist zu einem wesentlichen Faktor der Proteinproduktion und -analyse geworden. Mit der Kontrolle darüber, wann und wieviel eines Proteins exprimiert wird, hat man die Möglichkeit, zeit- und konzentrationsabhängige Effekte zu untersuchen.

Das induzierbare TRex-System (Tetracycline-Regulated Expression; Invitrogen, Karlsruhe) liefert hohe Proteinexpressionsdichten. Es besteht aus dem Cytomegalovirus-Promotor (CMV), einer der stärksten Promotor-Sequenzen in Säugerzellen und zusätzlichen Kontrollelementen des bakteriellen Tetracyclinresistenz-Operons, die den Promotor effektiv an- und ausschalten können. Das TRex System bedient sich dabei eines Repressors, der die Transkription vom CMV in Abwesenheit von Tetra/Doxycyclin blockiert. Zwei Tetracyclin-

Operator-Sequenzen sind zwischen der TATA-Box des CMV-Promoters und der Transkriptionsstartseite eingefügt. Wenn das Tetracyclin-Repressor Protein (TetR) anwesend ist, bindet es an die TetO2-Sequenz und blockiert die Transkription. Nach Zugabe von Tetracyclin bindet dieses an TetR, ändert dessen Konformation und veranlasst so das Ablösen von der TetO2-Region. Mit der Tetracyclinkonzentration kann die Höhe der Expression moduliert werden. In sämtlichen Messungen an TRex-Zellen betrug die Konzentration an Doxycyclin (Invitrogen, Karlsruhe), welches anstelle von Tetracyclin eingesetzt wurde, 1 µg/ ml.

Mit der Insertion des TetR-Gens wurde vom Hersteller auch eine Blastizidin-Resistenz in das Genom der Zelllinien eingefügt. Daher wurde der im weiteren Verlauf als HEK-TRex-wt bezeichnete Zellklon mit dem Selektionsantibiotikum Blastizidin kultiviert. Demgegenüber wurden durch die Einbringung der Fremd-cDNS Resistenzen für Zeocin importiert; daher wurden stabil transfizierte Zellen zusätzlich auch in Zeocin-haltigen Kulturmedien gezüchtet.

Kultivierungsmedien:

HEK293 TRex-wt :

Dulbecco's MEM mit den Zusätzen Glutamax, Glukose (4,5g/l) und Pyridoxin und ohne Natriumpyruvat (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe)

10%(v/v) tetFCS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe)

1%(v/v) Pen/Strep (Sigma Aldrich, Taufkirchen)

1% (v/v) NEAA (nicht-essentielle Aminosäuren, Invitrogen, Karlsruhe)

5µg/ml Blastizidin (Invitrogen, Karlsruhe)

HEK293 TRex MaxiK α + β :

siehe HEK TRex-wt +

600µg/ml Zeocin (Invitrogen, Karlsruhe)

CHO TRex-wt:

F-12 (HAM)-Medium mit Zusatz von L-Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe)

10%(v/v) tetFCS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe)

1%(v/v) Penicillin/Streptomycin (Sigma Aldrich, Taufkirchen)

10µg/ml (Invitrogen, Karlsruhe)

CHO TRex MaxiK α + β :

siehe CHO TRex-wt +

600µg/ml Zeocin (Invitrogen, Karlsruhe)

2.2.3 Primärkulturen

Glattmuskelzellen wurden aus Rattenaorten isoliert und als Primärkultur für maximal 10 Zellpassagen in Kultur gehalten. Isolation und Kultivierung wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Andre Markmann durchgeführt.

Kultivierungsmedium:

SMC-Primärkultur aus der Ratte

DMEM (niedrig Glukose) (Invitrogen, Karlsruhe)

10%(v/v) FCS (BD, Heidelberg)

1%(v/v) Penicillin/Streptomycin (Sigma Aldrich, Taufkirchen)

2.2.4 Auftauen der Zellen

Alle Zellen wurden bei -178°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Um die Zellen schnellstmöglich aufzutauen, wurde das Kryogefäß so lange in 37°C erwärmt, bis die 1ml-Zellsuspension verflüssigt war. Dann wurde die Lösung in ein steriles 50ml-PP-Gefäß überführt, vorsichtig 10ml 4°C -kaltes Medium tropfenweise zugegeben und anschließend für 5min mit $200\times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen, das Zellpellet in 5ml Medium resuspendiert und anschließend im geeigneten Volumen in T25-PP-Gefäßen (Greiner Bio-one, Frickenhausen) ausgesät.

2.2.5 Mediumwechsel

Nach zwei bis drei Tagen Inkubation wurde das alte Medium abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit je 10ml sterilem PBS (siehe 3.1.9) gewaschen und dann 10ml des entsprechenden Mediums zugesetzt.

2.2.6 Zellpassagierung

Die kultivierten Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Das alte Medium wurde abgesaugt, dreimal mit 10ml sterilem PBS (siehe 3.1.9) gewaschen und 5ml einer Accutaselösung (PAA Laboratories, Linz, A) zugegeben. Die T75-Flasche (Greiner Bio-one, Frickenhausen) wurde für exakt fünf Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die enzymatische Aktivität wurde durch Zugabe von 10ml des entsprechenden Mediums unterbunden und die Zellen blasenfrei resuspendiert. Durch eine fünfminütige Zentrifugation mit $200\times g$ bei RT wurden die Zellen pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde in 5ml frischem Medium resuspendiert und $100\mu\text{l}$ dieser Zellsuspension zur Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe eines Zell-Counters herangezogen (siehe unten).

Die Zellsuspension wurde sodann mit Medium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

Für die normale Zellpassierung im zweimaligen wöchentlichen Rhythmus waren dies etwa 0,5-3 Millionen Zellen pro T75-Flasche. Die so frisch umgesetzten Zellen wurden dann wieder bei 37°C/ 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

2.2.7 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mittels des Casy® Counters vorgenommen (Schärfe System, Reutlingen). 100µl Zellsuspension wurden mit isotonischer Kochsalzlösung auf ein Volumen von 20ml gebracht und in das Gerät eingeführt. In der Menüanzeige wurde das Programm für den entsprechenden Zelltypus gewählt und die Messung gestartet.

2.2.8 Ausplattieren der Zellen für Patch-Clamp- und Immunfluoreszenz-Experimente

Zum Ausplattieren der Zellen wurden kleine Glasplättchen (Nunc, Wiesbaden) verwendet. Fünf dieser Plättchen werden in eine 35mm Petrischale (Nunc, Wiesbaden) eingebracht, so dass der Boden vollständig bedeckt war, die Plättchen aber gegenseitig nicht überlappten. Auf die Glasplättchen wurde dann eine Zellzahl von 80.000-250.000 Zellen in 1ml ausgesät und 1ml Medium zugegeben.

Für immunzytochemische Messungen wurden ausschliesslich HEK293-Zellen verwendet, die in einer Zellzahl von 800.000 Zellen ausgesät und mit 1,5ml Medium aufgefüllt wurden. Aufgrund der geringen Anhaftung von HEK293-Zellen unter mechanischer Belastung wurden die Glasplättchen dabei einer besonderen Behandlung mit Poly-L-Lysin unterzogen.

Dazu wurden die Plättchen mindestens eine halbe Stunde mit Poly-L-Lysin im Brutschrank in 0,01%iger Konzentration (Sigma Aldrich, Taufkirchen) inkubiert. Danach erfolgte die Trocknung unter der sterilen Werkbank; sie wurden im Anschluss sofort weiterverwendet.

Die stabilen Zelllinien des TRex-Systems, HEK-Trex und CHO-Trex, wurden zum Zeitpunkt der Aussaat induziert. Dies geschah mit Doxycyclin (Invitrogen, Karlsruhe) in einer Konzentration von 1µg/ ml.

2.2.9 Transiente Transfektion von Säugetierzellen

Zur Transfektion wurden je nach Zelltyp verschiedene Protokolle verwendet. Zunächst wurden transiente Transfektionen für Patch-Clamp-Messungen mit Fugene6 (Roche Biochemicals, Mannheim) durchgeführt. Dieses wurde aber später aufgrund der Transfektionseffizienz durch die Transfektion mit Lipofectamin2000 (Invitrogen, Karlsruhe) ersetzt. Lag die Transfektionsrate vorher bei 10-20%, so konnte sie mit Lipofectamin2000 auf 40-80% gesteigert werden. Im folgenden wird deshalb nur die Transfektion mit Lipofectamin2000 detailliert und für die einzelnen Zelltypen modifiziert aufgeführt.

Obwohl es Unterschiede im Transfektionsprotokoll bei den verschiedenen Zelltypen gibt, arbeitet man bei der Transfektion mit Lipofectamin2000 pro Transfektionsansatz mit zwei

verschiedenen Phasen, die später vereinigt und auf die vorbereiteten Zellen gegeben werden. Wie bei allen anderen Transfektionsreagenzien ist darauf zu achten, während der Transfektion in FCS-freiem Medium zu arbeiten, da FCS die Transfektion durch unspezifische Absorption der Transfektanten erschwert.

2.2.9.1 Transfektion von HEK293-Zellen

Die erste Phase bestand aus 200µl Opti-MEM, einem FCS-freien Kulturmedium (Fa.Gibco, Karlsruhe), das sich in einem speziellen Transfektionsröhrchen (Greiner Bio-one, Frickenhausen) befindet. Zu diesen 200µl Opti-MEM wurden ca. 8-12µl Lipofectamin2000 (Invitrogen, Karlsruhe) gegeben. 10µl Lipofectamin2000 wurden dabei als Optimum ermittelt.

Die zweite Phase bestand aus 200µl Opti-MEM in einem zweiten Transfektionsröhrchen, dem die entsprechende cDNS und GFP als Transfektionskontrolle hinzugefügt wurde. Die eingesetzte Menge der DNS des zu untersuchenden Proteins betrug 2,5-5µg, die des GFP 0,3µg. Es ist nicht notwendig, die Komponenten zuvor zu mischen; beide können nacheinander dicht unter die Oberfläche des Opti-MEMs zupipettiert werden.

Beide Einzelphasen, Opti-MEM mit Lipofectamin 2000 und Opti-MEM mit DNS wurden vor ihrer Vereinigung fünf Minuten ruhen gelassen, bevor die DNS-Opti-MEM Mischung langsam in die Lipofectamin-Opti-MEM Mischung geträufelt und die vereinigten Phasen für mindestens zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit PBS gewaschen, um das Serum zu entfernen und das Kulturmedium durch 2ml Opti-MEM zu ersetzen.

Anschließend wurde die Transfektionslösung auf die Zellen geträufelt, sodass die Lösung gleichmäßig auf die fünf Plättchen in der 35mm Petrischale verteilt wurde. Für die verschiedenen Zelltypen muss die Zeitdauer der Inkubation mit der Transfektionslösung bestimmt werden, da eine Überexposition des Lipofectamins aufgrund seines lipogenen Charakters eine toxische Wirkung auf die Zellen zur Folge hat (siehe auch 2.4.9.2).

Für Patch-Clamp-Messungen an transient transfizierten Zellen wurden die HEK293-Zellen nach 10-12h auf normales Kulturmedium zurückgesetzt. Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurde in der Regel vor Beginn der Behandlung mit den verschiedenen Waschpuffern des immunzytochemischen Protokolls nicht mehr auf Kulturmedium gewechselt, sondern die Zellen direkt über Nacht in der Transfektionslösung belassen.

2.2.9.2 Transfektion der EAhy926-Zellen

Im Falle der modifizierten Endothelzelllinie EAhy926 mussten die Bedingungen des oben angegebenen Protokolls etwas angepasst werden. Besonders die Einwirkzeit der Transfektionslösung auf die Zellen wurde stark verkürzt. Das Zeitfenster zwischen erfolgreicher Trans-

fektion, sprich Aufnahme der DNA in die Zelle und Überhandnehmen des toxischen Effektes des Lipofectamins 2000 auf die Zellen, ist extrem klein, wie zahlreiche Vorversuche ergaben.

Die Zellen wurden in diesem Falle direkt auf Glasplättchen in einer 24-well Platte (Nunc, Wiesbaden) kultiviert. Einen Tag vor der Transfektion wurden dafür ca. 100.000 Zellen pro Vertiefung ausgesät.

Pro Transfektionsansatz wurde folgende Phasen hergestellt:

1. Phase: 50µl Opti-MEM (Gibco) + 1,5µl Lipofectamin 2000)
2. Phase: 50µl Opti-MEM (Gibco) + 2µg Plasmid-DNS + 0,5µg GFP

Nach einer Wartezeit von 5 min wurden beide Phasen vereinigt und weitere 20min gewartet. Die zu transfizierenden Zellen wurden in der Zwischenzeit mit PBS gewaschen und pro Vertiefung wurden 500µl Opti-MEM vorgelegt. Nachdem 100µl Transfektionslösung zugetropft worden waren, inkubierten die Zellen auf der Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur, bevor der Wechsel auf Kulturmedium erfolgte. Nach 24-48h Inkubation im Brutschrank erfolgte die Immunfluoreszenzanalyse.

2.3 Elektrophysiologische Methoden

Allgemein. Im Gegensatz zu Pumpen und Transportern ermöglichen Ionenkanäle eine passive Diffusion bestimmter Ionenarten durch die ansonsten weitgehend impermeable Lipid-Doppelschicht. Die Ionen bewegen sich dabei entlang ihres jeweiligen elektrochemischen Gradienten, der vom Membranpotential sowie der intra- und extrazellulären Konzentration des jeweiligen Ions bestimmt wird. Beim Ruhepotential heben sich die elektrochemischen Potentiale aller Ionenspezies auf, und es fließt keine Nettoladung durch die Membran. Ändert sich das Membranpotential, so führt dies zu einer Ladungsverschiebung und zu einem messbaren Strom.

In Abhängigkeit vom Membranpotential, extra- oder intrazellulären Liganden und Signalmolekülen können Ionenkanäle geöffnet, geschlossen oder inaktiviert werden. Die Öffnung erfolgt in den meisten Fällen nach dem „Alles oder nichts“-Prinzip mit einer spezifischen Kanal-leitfähigkeit, wobei die Offenwahrscheinlichkeit einer Boltzmann-Verteilung entspricht. Ein makroskopischer Strom ist demnach das Produkt aus der spezifischen Leitfähigkeit und der Öffnungswahrscheinlichkeit der betreffenden Ionenkanalpopulation. Sowohl die Ladung des bewegten Substrates als auch die Expressionsdichte des leitenden Proteins in der Membran bestimmen die Stromamplitude.

2.3.1 Patch-Clamp-Technik an kultivierten Säugetierzellen

2.3.1.1 Patch-Clamp-Techniken

Die Patch-Clamp Technik (Hamill *et al.*, 1981) ermöglicht die Messung makroskopischer Ströme sowie Ströme durch einzelne Ionenkanäle im Nanoampere- bzw. Picoampere-Bereich. Durch eine isolierende Abdichtung (engl. seal) zwischen der mit Salzlösung gefüllten Pipette und der Plasmamembran werden hohe Widerstände zur Badlösung erzeugt, die $>1\text{G}\Omega$ betragen sollten („gigaseal“). Auf diese Weise wird ein akzeptables Signal-Rausch-Verhältnis ermöglicht, welches die Voraussetzung für die Messung von Ionenkanalströmen ist. Der hohe elektrische Widerstand gewährleistet außerdem, dass die gemessenen Ströme ausschließlich durch Transportsysteme oder Ionenkanäle des isolierten Membranbereichs (engl. patch, Flecken) oder mit der mit der Pipette verbundenen Zellmembran zustande kommen.

2.3.1.2 Patch-Clamp-Konfigurationen

Nach Hille, 2003 unterscheidet man 4 verschiedene Modi (siehe Abb.3):

Cell-attached Konfiguration. Mit der Bildung des oben beschriebenen Gigaseals befindet sich die Zelle in der Cell-attached Konfiguration. Die Membran unter der Pipette bleibt bei dieser Messanordnung intakt, wird allerdings durch das Einsaugen in die Pipette etwas deformiert. Auf der intrazellulären Seite der Membran befinden sich alle Proteine in ihrer natürlichen Umgebung, das heißt, alle Signalwege sowie die intrazellulären Ionenkonzentrationen bleiben unbeeinflusst. Dies ist der wesentliche Vorteil des Cell-attached-Modus, denn zahlreiche Kanäle werden durch die Aktivität von Phosphatasen oder Kinasen, sowie andere intrazelluläre Mechanismen moduliert. Auch das zelleigene Ruhemembranpotential bleibt bei dieser Anordnung erhalten. Nur unterhalb der Pipette wird das extrazelluläre Potential vom Verstärker kontrolliert.

Inside-out Konfiguration. Bei der inside-out Konfiguration ist die zytoplasmatische Oberfläche des Membranpatches der Badlösung zugewandt. Um einen inside-out-Patch zu erhalten, wird zuerst ein sehr guter cell attached-Seal hergestellt. Zieht man dann die Pipette langsam von der Zelle weg, löst sich ein Membranstück ab, ohne dass der Sealwiderstand merklich abnimmt. Frisch dissoziierte Zellen sollten genügend Zeit haben, am Boden anzuhafte (z.B. durch die Beschichtung mit Poly-L-Lysin), so dass sie beim Zurückziehen der Pipette nicht vom Boden abgezogen werden.

Das ausgerissene Membranstück enthält nicht nur die integralen Proteine, sondern oft auch Strukturen, die an der Membranninnenseite haften, wie Teile des Zytoskeletts, Signaltransduktionsproteine oder Organellen. Allerdings werden niedermolekulare Bestandteile (z.B. ATP oder IP_3) ausgewaschen mit der Folge, dass viele regulatorische Vorgänge an den Kanälen verändert werden. Das Ergebnis ist häufig ein sogenannter Rundown-Effekt: Unab-

hängig von der Aktivierung der Ionenkanäle werden die gemessenen Ströme mit fortschreitender Dauer des Experiments immer kleiner. Häufig kann dem durch Zusatz von Mg-ATP oder anderen Änderungen der Pipettenlösung Abhilfe geleistet werden.

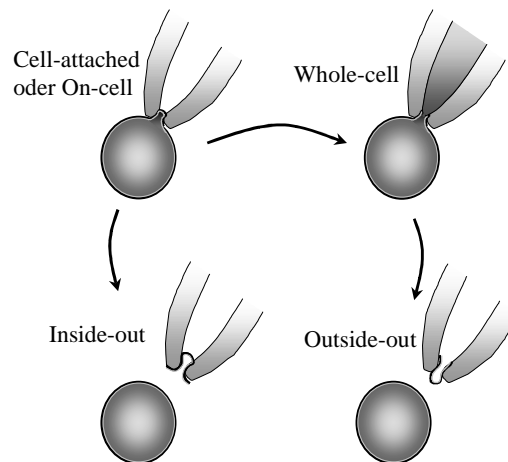


Abb.3: Patch-Clamp-Konfigurationen nach Hille, 2003

Whole-cell Konfiguration. Die sogenannte Ganzzelleableitung (engl. whole cell) wurde in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis der Interaktion vom MaxiK Kanal mit bestimmten Signalwegen verwendet und stellt die meist verwendete Patch-Clamp-Technik dar. Sie erfasst im Gegensatz zu den anderen Modi die gesamte Membran einer Zelle und nicht nur den Bereich unter der Pipettenmündung. Man kann solche Ganzzellmessungen als eine Art Mittelung vieler simultaner aktiver Ionenkanäle auffassen. Sie geben das makroskopische Strommuster einer Zelle wieder. Dies hat den Vorteil, dass die Auswertung in vielen Fällen schneller und einfacher ist als die von Einzelkanalmessungen.

Um in die Ganzzell-Konfiguration zu gelangen, stellt man einen cell-attached Patch her (siehe Abb.3) und durchbricht dann den Membranbereich unter der Pipette durch Anlegen eines Unterdrucks. Wenn dabei der seal erhalten bleibt, und damit die Leckströme gering sind, misst man nicht mehr nur den Strom durch den kleinen Patch, sondern den Strom, der durch die gesamte Membranfläche der Zelle fließt. Die Lösung im Pipetteninneren ist beim Ganzzell-Modus direkt mit dem Inneren der Zelle verbunden, so dass nach einer Äquilibrierungszeit von Sekunden bis Minuten das Zellinnere mit der Pipettenlösung gefüllt ist. Ströme aus der Pipette heraus fließen über die Zellmembran nach außen und umgekehrt.

Die Geschwindigkeit des Stoffaustausches zwischen Pipette und Zelle hängt vom Durchmesser der Pipettenspitze und vom Volumen der Zelle ab, dabei findet der Austausch von Ionen wesentlich schneller als der von Makromolekülen statt. Da das Volumen der Pipetten

wesentlich größer als das Zellvolumen ist, bleibt die Zusammensetzung der Pipettenlösung weitgehend unverändert.

Einerseits verliert das Zytoplasma durch den Stoffaustausch mit der Pipette seine natürliche Zusammensetzung und damit auch Substanzen wie ATP und IP_3 , die möglicherweise für die Funktion der untersuchten Kanäle notwendig sind. Dies kann die Messergebnisse verfälschen. Andererseits kann der Experimentator in der Ganzzell-Konfiguration das intrazelluläre Milieu genau kontrollieren und besondere Substanzen in die Zelle einbringen.

In der praktischen Durchführung wurde nach Ausbildung der cell attached-Konfiguration und Kompensation der kapazitiven Ströme ein negatives Haltepotential hergestellt, das in etwa dem Ruhemembranpotential der Zelle entsprach. Dann wurde die Membran durchbrochen, indem man mittels einer Glasspritze mit Schliffkolben vorsichtig einen Unterdruck erzeugte. Das Potential der Zelle wurde dann durch das Kommandopotential vorgegeben.

Outside-out Konfiguration. Von der Ganzzelleableitung gelangt man in die outside-out-Konfiguration, indem man die Pipette sehr langsam axial von der Zelle abzieht. Wie bei der inside-out-Konfiguration löst sich ein Stück der Membran und schließt sich über der Pipette als eine Art Halbvesikel. Die Außenseite der Zellmembran ist also der Badlösung zugewandt. Der Nachweis, ob eine inside-out- oder outside-out-Konfiguration vorliegt, muss im Anschluss experimentell erbracht werden.

2.3.1.3 Aufbau des Patch-Clamp-Messplatzes

Der Aufbau eines Patch-Clamp-Messplatzes, des sogenannten „Setups“, hängt von der Art des Experimentes ab. Der im folgenden beschriebene Messplatz kann jedoch exemplarisch zur Erläuterung dienen. Herzstück des Setups ist ein inverses Mikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss, Göttingen). Der inverse Aufbau hat den Vorteil, dass man von unten auf das Präparat blickt und so darüber viel Platz für die Pipette, die Badperfusion und andere Aufbauten bleibt. Die verwendeten Objektive besaßen eine 10-20fache Vergrößerung, um Zellen im Überblick lokalisieren zu können und eine 40fache Vergrößerung, um Zellen ausreichend groß darstellen zu können. In der Mitte des Mikroskoptisches befindet sich die Messkammer, mit einer zentralen muldenförmigen Vertiefung, um ein Glasplättchen mit den darauf kultivierten Zellen aufnehmen zu können. Weiterhin sind Aussparungen für Zu- und Ablauf, sowie die Badelektrode vorgesehen. Der Zulauf der Lösung ist aus alternativ wählbaren Vorratsgefäßen möglich. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug im Durchschnitt 125ml/min. Die Absaugung der Badlösung erfolgt über das zentrale Unterdrucksystem des Messplatzes. Die Messpipette befindet sich im Pipettenhalter. Dieser muss die Patchpipette sicher und stabil fixieren, das Anlegen eines Unter- bzw. Überdruckes ermöglichen und die elektrische Verbindung zum Verstärker herstellen. An den seitlichen Eingängen des Pipettenhalters ist ein Schlauch angeschlossen, über den man Über- und Unterdruck ans Pipetteninnere anlegen kann. Um die

Patchpipette präzise auf die oft nur wenige Mikrometer große Zelle aufsetzen zu können, ist ein motorgetriebener Mikromanipulator unverzichtbar.

Ein Ag/AgCl-Draht sorgt für die elektrische Verbindung zwischen Pipette und dem Vorverstärker, engl. headstage oder probe. Der Vorverstärker ist ein Teil des patch clamp-Amplifiers (EPC 10, HEKA Elektronik Dr. Schulze, Lambrecht). Da er stabil und erschütterungsfrei möglichst nahe an der Messkammer befestigt sein sollte, ist er auf eine Platte am Mikromanipulator aufgeschraubt. Im Vorverstärker ist ein Schaltkreis untergebracht, der einen sogenannten Strom-Spannungswandler darstellt. Dessen wichtigste Elemente sind der Operationsverstärker (OPV) und der Rückkopplungswiderstand (siehe Abb.4).

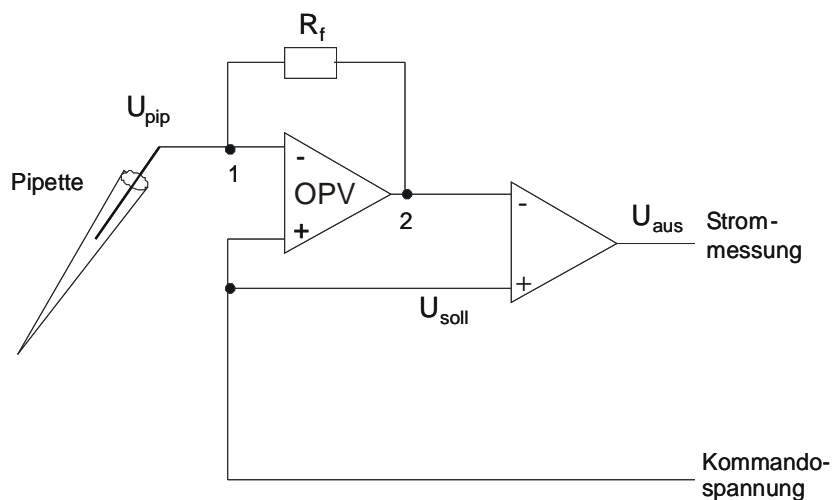


Abb.4: Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-clamp-Verstärkers (Numberger & Draguhn, 1996). OPV: Operationsverstärker, R_f : Rückkopplungswiderstand, U_{aus} : Ausgangsspannung proportional zum Strom, U_{pip} : Pipettenpotential, U_{soll} : Kommando- oder Sollspannung. Nähere Erläuterungen im Text

Das Funktionsprinzip des OPV besteht darin bei Spannungsdifferenzen zwischen beiden Eingängen eine Spannung am Ausgang zu generieren. Diese Spannung wird solange variiert und über den Rückkopplungswiderstand R_f auf den invertierenden Eingang des OPV zurückgeführt (der mit der Patchpipette verbunden ist), bis die Spannungsdifferenz zwischen den Eingängen aufgehoben ist. Auf diese Weise wird gewährleistet, daß die Kommando-spannung U_{soll} stets an der Patchpipette anliegt (voltage clamp). Das Öffnen und Schliessen von Ionenkanälen führt zu einem Stromfluss und einem damit verbundenen Spannungsabfall am hochohmigen invertierenden Eingang. Um diesen Spannungsabfall zu kompensieren wird über R_f ein entgegengesetzter Strom injiziert. Die dazu nötige Ausgangsspannung (U_{aus}) ist den zu messenden Ionenströmen proportional, wobei der Verstärkungsfaktor durch die Grösse von R_f bestimmt wird. Im zweiten Teil des Patch- Clamp-Verstärkers, dem sogenannten Hauptverstärker, wird das Ausgangssignal (U_{aus}) `geboosted`, verstärkt und gefiltert. Der EPC 10 Verstärker in Kombination mit der Software Pulse (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht) erlaubt es, die kapazitiven Ströme der Pipette und der Zellmembran, die

durch die applizierten Spannungssprünge verursacht werden, teilweise wieder auszugleichen. Dabei können die schnelle Kapazität der Pipette und die langsame Komponente der Zellmembran über eine „schnelle“ und „langsame“ Kompensation des Verstärkers ausgeglichen werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit einer elektrischen Serienwiderstands- und einer Offsetkompensation. Auch eine nachträgliche Filterung der gemessenen Ströme mit verschiedenen Bandbreiten ist optional. Die Messdaten, die den Verstärker verlassen, werden direkt betrachtet und langfristig gespeichert (Software: HEKA Pulse und Pulsefit). Noch erwähnt sei, dass um eine mechanisch störungsfreie Messung zu gewährleisten, sich Mikroskop, Messkammer und Mikromanipulator mit Pipettenhalter, sowie Vorverstärker auf einem schwingungsgedämpften Messtisch befinden. Zum Zwecke der elektrischen Abschirmung und um ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, ist der gesamte Messplatz von einem Faraday-Käfig umgeben.

2.3.1.4 Vorbereitungen

Die Patch-Pipetten wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament (Hilgenberg, Malsfeld) mit einem automatischen Ziehgerät (Zeit Instrumente GmbH, München) in drei Stufen gezogen und anschließend die Spitzen hitzepoliert. Für die Experimente wurden Patch-Pipetten mit einem Widerstand von 1,5 –3,5M Ω verwendet.

Sämtliche Messungen fanden bei RT statt.

Einen Tag vor Beginn der patch-clamp Experimente wurden die Zellen auf Glasplättchen (Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Vor Ausplattieren der HEK293-Zellen war es notwendig, die Plättchen mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) vorzubehandeln (Inkubation für 30min bei 37°C), um eine bessere Bodenhaftung zu erzielen. Für Experimente im whole-cell Modus wurden 80.000 Zellen pro 35mm Petrischale ausgesetzt, bei CHO-Zellen ca. 40.000 Zellen. Auf diese Weise war gewährleistet, dass genügend vereinzelte Zellen zu finden waren. Für Experimente im inside-out Modus wurde die Zahl verdoppelt bis verdreifacht.

2.3.2 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an *Xenopus laevis* Oozyten

Die Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* sind nicht ausdifferenzierte, omnipotente Einzelzellen. Sie eignen sich gut als heterologes Expressionssystem für die Untersuchung von Proteinen wie Ionenkanäle oder Membranrezeptoren. Die entsprechende cRNS wird in die Oozyte injiziert. Je nach Protein kann die Expression an der Oberfläche nach ein bis sieben Tagen nachgewiesen werden. Dabei gewährleistet die Oozyte durch ihre hohe Translationseffizienz gute Proteinausbeuten bei geringem RNS-Einsatz. Die Funktion der exprimierten Proteine kann dann durch die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (engl.: two electrode voltage clamp, TEVC) oder, wie bereits vorher erwähnt, mittels Patch-Clamp-Verfahren untersucht werden.

2.3.2.1 Isolierung von Oozyten aus *Xenopus laevis*

Ein erwachsener weiblicher Frosch wurde vor Entnahme der Oozyten ca. 20min in einer 0,1%igen 3-Aminobenzoessäureethylester-Lösung (Tricain, Sigma Aldrich) narkotisiert. Der Frosch wurde dabei direkt aus dem Becken in ein großes Becherglas mit Narkoselösung gesetzt. Vor der Operation wurde das Tier zur Narkosekontrolle auf den Rücken gedreht. Fehlte der natürliche Reflex zur Rückkehr in die Bauchlage, konnte mit der Operation begonnen werden. Für die Operation selbst wurde der Frosch in ein Eisbett gelegt, zum einen um die erreichte Narkosetiefe aufrecht zu erhalten, zum anderen um auftretende Blutungen zu verringern. Alle Körperteile bis auf den Unterbauch wurden durch Zellstoff leicht feucht gehalten um ein Austrocknen der Haut zu verhindern. Mit einer sterilen chirurgischen Pinzette und Schere wurde der Bauchraum eröffnet. Dazu durchtrennte man die Bauchhaut, Muskelfaszie und Muskelschicht auf einer Länge von ca. 10mm. Dann wurde durch den so gewonnenen Zugang einen Teil der Mesovarien entnommen, indem diese mit einer feinen Schere abgetrennt wurden. Zum Verschließen der Wunde wurde zuerst die Muskelschicht und dann die Bauchhaut mit zwei Stichen genäht. Als Nahtmaterial wurde resorbierbares Polyglactin (Firma Ethicon, Norderstedt) verwendet. Nach der Entnahme wurde der Körper des Frosches ausreichend mit Leitungswasser abgespült und anschließend zum Aufwachen in einen entsprechenden Behälter mit Leitungswasser gelegt. Dabei ist zu beachten, dass die Atmungslöcher über der Wasseroberfläche sind, der Körper aber ausreichend feucht gehalten wird.

Die entnommenen Mesovarien wurden sofort nach der Entnahme in kalziumfreie OR-2 Präparationslösung gelegt und zur Oberflächenvergrößerung mit Pinzette und Schere in Stücke von ca. 10 Oozyten zerteilt. Die so zerteilten Mesovarien wurden mehrmalig mit OR-2 Lösung gewaschen und danach zur Vereinzelung und Defollikulierung mit 20ml einer Kollagenaselösung versetzt (40mg Kollagenase, Worthington Biochemical Corporation, auf 20ml OR-2). Die Kollagenasebehandlung erfolgte bei 18°C auf einem Schüttler (20Upm), dabei wurden die Oozyten nach 60min mit einer abgeschnittenen Kunststoffpipette auf- und abpipetiert, was man dann alle 30 Minuten wiederholte. Nach etwa 120 Minuten war die Kollagenasebehandlung abgeschlossen und die Oozyten wurden unter dem Mikroskop auf vollständige Vereinzelung und Defollikulierung beurteilt. War dies der Fall, wurden sie abschließend 10-15 mal mit ND96 gewaschen, um eine Entfernung der Kollagenase zu gewährleisten.

Aus der Menge der so erhaltenen Oozyten aller Wachstums- und Reifestadien wurden dann unter dem Stereomikroskop die voll ausgewachsenen und unbeschädigten Oozyten des Reifestadiums V und VI aussortiert. Als Auswahlkriterien dienen dabei Größe, Form, Pigmentierung sowie eventuelle Verletzungen der Oozyte.

Die selektierten Oozyten wurden bis zur Injektion bei 18°C auf einem Schüttler (20Upm) in antibiotikahaltiger ND-96 Lösung aufbewahrt, um ein Aneinanderhaften der einzelnen Oozyten und einer daraus resultierenden Deformation vorzubeugen.

2.3.2.2 cRNS-Injektion der *Xenopus laevis* Oozyten

Die Injektion der cRNS in die Oozyten erfolgte unter dem Stereomikroskop. Aufgrund der Empfindlichkeit der RNS gegenüber RNAsen wurde mit Latex-Handschuhen gearbeitet und RNase-freie Pipettenspitzen verwendet.

Mit Hilfe eines automatischen Mikroelektroden-Ziehgerätes (DMZ-Universal Puller der Firma Zeitz Instrumente, Augsburg) wurden die Glaskapillaren (Borosilikat, Aussendurchmesser 1,2mm; World Precisions Instruments, Sarasota, USA) zu Mikrokapillaren mit langer Spitze gezogen. Ein Teil der Spitze wurde mit einem kalten Heizdraht unter dem Stereomikroskop abgebrochen und danach an dem erhitzten Draht zu einer Kanüle ausgezogen (Durchmesser der Kapillare 10-15µM). Der Durchmesser der Spitze war groß genug, um die cRNS-Lösung blasenfrei aufzusaugen und beim Injizieren wieder abzugeben, aber auch klein genug, um die Verletzung der Oozytenmembran möglichst gering zu halten.

Die Injektion der cRNS erfolgte mit Hilfe eines vollautomatischen Nanoliterinjektors (World Precisions Instruments, Sarasota, USA), der in einen Mikromanipulator eingespannt war.

Der Kolben des Nanoliterinjektors wurde in eine vollständig mit Paraffinöl (Sigma 400-5 heavy white oil, Dichte= 0,88g/ml) befüllte Injektionskapillare eingeführt. Mit Hilfe des Paraffinöls erreicht man eine luftblasenfreie Füllung der Kapillare, wodurch die Genauigkeit der Nanoliterinjektion sichergestellt wird.

Es wurden 3-5µL der cRNS aufgezogen und jeweils 50nl pro Oozyte in einem Winkel von ca. 45° injiziert. Bei einer Konzentration der cRNS-Lösung von 0,2-1µg/µl entspricht dieses Volumen 10–50ng cRNS.

Während der Injektion befanden sich die Oozyten auf einem Gitternetz in einer kleinen Petrischale, die mit ND96-Lösung befüllt war.

Nach der Injektion wurden die Oozyten in 24-Loch-Gewebekulturplatten (Greiner, Frickenhausen) mit jeweils 1ml antibiotikahaltiger ND96-Aufbewahrungslösung vereinzelt und bei 18°C gelagert. Je nach Protein dauerte es ein bis sieben Tage, bis entsprechende Ionenströme gemessen werden können.

2.3.2.3 TEVC-Methode

Um die Ströme einer ganzen Oozyte unter unveränderten intrazellulären Bedingungen zu bestimmen, bietet sich die Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemme an. Bei dieser Methode wird die eine Elektrode dazu verwendet, das Membranpotential gegen eine Referenzelektrode im Bad (Silberchloridpellet oder Agarbrücke) zu messen. Die zweite Elektrode dient dazu,

Strom zu injizieren, der nötig ist, um ein vom Experimentator gewünschtes Potential zu halten. Anders ausgedrückt kann das Membranpotential einer Zelle auf einen Spannungswert geklemmt und somit der Strom bestimmt werden, der appliziert werden muss, um die Zelle auf dem gewählten Potential zu halten (Hodgkin *et al.*, 1952; Bezanilla *et al.*, 1982).

2.3.2.4 Aufbau des TEVC-Messplatzes

Der gesamte TEVC-Messplatz war auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Vibraplane, Kinetic Systems) aufgebaut. Um den Messtisch befand sich ein Faraday-Käfig, um elektrische Störungen bei der Messung möglichst gering zu halten. Innerhalb des Messkäfiges waren alle Metallgeräte mit Erdungskabeln versehen. In der Mitte des Experimentiertisches befand sich die im Hause gefertigte Plexiglaskammer (3,5ml Fassungsvermögen) mit einem Gitternetz. Die Oozyten wurden während der Messung konstant von der entsprechenden Badlösung umspült. Der Zulauf der Lösungen erfolgte über mehrere Vorratsbehälter, die durch Silikonschläuche mit der Messkammer verbunden waren und mittels hydrostatischem Druck arbeiten. Die Flussgeschwindigkeit der Zulauflösung betrug in der Regel 20ml/min., d.h. nach etwa 15s war die Messkammerlösung komplett ausgetauscht. Ein weiterer Silikon-schlauch, der über eine Waschflasche mit einer elektrischen Pumpe (KNF Neuberger GmbH, Freiburg i. Br.) verbunden war, sorgte für die Absaugung aus dem Kammer-Überlauf. Links und rechts der Messkammer befanden sich manuelle Mikromanipulatoren (World Precisions Instruments, Berlin), die zur Führung der Messelektroden dienen. Diese wiederum waren mit dem TEVC-Verstärker (Turbotec-10CX, NPI Electronic, Tamm) verbunden.

2.3.2.5 Vorbereitung und Durchführung

Mit einem DMZ-Universal Puller (Zeitz, Augsburg) wurden die zum Einstechen in die Oozyten verwendeten Mikroelektroden aus Borosilikatglas (GC 150TF-15, 1,5mm Aussendurchmesser, 1,17mm Innendurchmesser, dünnwandig mit Innenfilament 5 (Clark Elektromedical Instruments, Pangbourne, England) gezogen.

Die Ag/AgCl Elektrodendrähte der Pipettenhalter tauchten in die mit 3M KCl-Lösung befüllten Pipetten ein. Die Mikroelektroden sollten dabei einen Widerstand von 0,2-1,2M Ω haben. Als Referenzelektroden dienten zwei Ag/AgCl-Pellets. Die Versuchstemperatur lag bei 22°C. Das kontrollierte Einstechen in die Oozyte wurde mit einem Stereomikroskop (Zeiss, Augsburg) oberhalb der Messkammer kontrolliert. Die Beleuchtung gewährleistete dabei eine durch Gleichstrom betriebene Halogenlampe (Schott). Sämtliche Daten wurden vom TEVC Verstärker über ein Interface (ITC-16, Instrutec Corporation, Long Island, USA) in einem Pentium-II-Computer aufgenommen und ausgewertet (Pulse und Pulsefit Software, HEKA Elektronik, Lambrecht).

2.3.3 Verwendete Lösungen und Puffer

2.3.3.1 Patch-Clamp-Verfahren

E1-Lösung (Durchflusslösung für Ganzzelleableitungen, bei inside-out Konfigurationen Pipettenlösung, in mM):

NaCl	135
CaCl ₂	2 (aus 1 M Maßlösung zugesetzt)
MgCl ₂	1
KCl	5,4
HEPES	10
Glukose	10 (frisch zugesetzt)

pH Wert mit NaOH Rotuli auf 7,35 einstellen

Osmolarität : 297mos/ml

Pipettenlösungen für Ganzzelleableitungen:

A) für 100µM freies Ca²⁺ (in mM):

NaCl	10
KCl	120
HEPES	10
EGTA	1
MgATP	2
CaCl ₂	1,25 (aus 1M Maßlösung)

entspricht 100µM freies Kalzium
pH7,2 mit KOH

B) für 100nM freies Ca²⁺ (in mM):

NaCl	10
KCl	120
HEPES	10
EGTA	1
MgATP	2
CaCl ₂	0,4 (aus 1M Maßlösung)

entspricht 100nM freies Kalzium
pH7,2 mit KOH

Die Pipettenlösungen für Einzelkanalableitungen entsprachen denen der Ganzzellkonfiguration mit Ausnahme des Zusatzes von MgATP.

War die Sealbildung erschwert, so wurde 2mM MgCl₂ zugesetzt.

2.3.3.2 TEVC-Methode

Die Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien für die *Xenopus laevis* Oozyten ist im folgenden dargestellt (in mM):

	<u>ND-96</u>	<u>antibiotikahaltige</u> <u>ND-96</u>	<u>OR-2</u>
NaCl	96	96	82,5
KCl	2	2	2
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,8	1,8	0
MgCl ₂ x 2H ₂ O	1	1	1
HEPES	5	5	5
Natriumpyruvat	0	2,5	0
Theophyllin	0	0,5	0
Gentamycin	0	50µg/ml	0
pH-Wert (mit NaOH eingestellt)	7,5	7,5	7,5

2.4 Immunzytochemische Arbeiten

Zur Detektion des MaxiK α -Proteins mittels Immunfluoreszenz wurde der extrazelluläre Amino terminus des Kanals mit einer Hämagglutinin (HA)-Sequenz gekoppelt und dieses Antigen mit einem anti-HA-Antikörper (Anti-HA High Affinity Antikörper, Biochemicals, Mannheim) nachgewiesen.

2.4.1 Vorbereitungen zur Immunfluoreszenzanalyse von HEK293-Zellen

HEK 293-Zellen wurden in einer Dichte von etwa 8×10^5 Zellen/ml auf sterilen, mit Poly-L-Lysin behandelten Glasplättchen (Nunc, Wiesbaden) ausgesät und etwa 24 Stunden später mit Lipofectamin 2000 transfiziert (siehe 2.2.6). Die Immunfluoreszenzanalyse erfolgte in einem Zeitfenster von 16-24 Stunden nach Transfektion. Zuvor wurde die Transfektionseffizienz mit Hilfe der Expression von GFP („green fluorescent protein“) abgeschätzt.

2.4.2 Durchführung

Fixierung in Paraformaldehyd

Um die Handhabung der einzelnen Plättchen mit den transient transfizierten Zellen zu erleichtern, wurden diese in eine 24-well Platte (Greiner Bio-one, Frickenhausen) umgesetzt. Dabei wurde in jede Vertiefung bereits ein Volumen von 500µl MTSB-Puffer (Mikrotubulus-stabilisierender Puffer (Zusammensetzung, siehe 2.3.9) vorgelegt. Die Zellen wurden 5min bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von weiteren 20min Inkubationszeit bei 37°C mit 2% Paraformaldehyd in MTSB (500µl pro Vertiefung und Glasplättchen).

Permeabilisierung der Zellmembran

Durch die Wahl der Zellvorbehandlung konnte zwischen plasmamembranären und intrazellulären Protein unterschieden werden. Im Falle einer Zellpermeabilisierung wurden alle Antigene exponiert, unter nicht-permeabilisierten Bedingungen konnten nur membranständige Kanäle detektiert werden.

Um den Antikörpern den Zugang zum Zellinneren zu gewährleisten, erfolgte eine 3-5 minütige Behandlung mit 1% TritonX-100 (Merck, Darmstadt) in PBS. Die Einwirkzeit wurde kurz gehalten, um eine Zellschädigung durch Überexposition zu vermeiden.

Blockierung unspezifischer Epitop-Erkennung

Um die unspezifischen Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurden die Glasplättchen unter Schütteln eine Stunde bei 37°C mit einem Serumalbumin-haltigen Puffer inkubiert (Zusammensetzung, siehe 2.3.9), der im Anschluss durch zweimaliges Waschen mit PBS wieder entfernt wurde.

Inkubation des Erstantikörpers

Die Zellen wurden mit 200µl einer 1:50 Verdünnung des anti-HA für 45-60min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Der kommerziell erhältliche Antikörper aus der Ratte erkennt die bei der Klonierung eingefügte Hämagglutinin-Sequenz (HA-tag). Anschließend wurde mindestens dreimal mit 500µl PBS für 2-5 Minuten gewaschen, um ungebundenen Erstantikörper zu entfernen.

Inkubation des Sekundärantikörpers

Als sekundärer Antikörper wurde Alexa Fluor 546 goat anti rat IgG (Molecular Probes, Mo Bi Tec, Göttingen), welcher in Ziege gegen ImmunoglobulinG der Ratte entwickelt wurde, in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt und in einem Volumen von 200µl auf die einzelnen Glasplättchen pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 40-60min. Wie beim Erstantikörper erfolgte ein dreimaliges Waschen auf dem Schüttler mit PBS sowie einmal mit destilliertem Wasser, um eine Salzkristallbildung bei der Fixierung der Plättchen auf Objektträgern zu verhindern.

Fixierung der Glasplättchen

Auf Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) wurde ein Tropfen Permafluor (Immuno-tech, Marseille) gegeben. Das Glasplättchen mit den gewaschenen Zellen wurde mit einer Pinzette aus der Plattenvertiefung herausgeholt und verkehrt herum, d.h. mit der Zellseite nach unten auf dem Objektträger fixiert. Bevor eine Auswertung am konfokalen Mikroskop

erfolgen kann, trockneten die Zellen entweder 2-3 Stunden bei 37°C oder über Nacht bei 4°C.

Detektion und Auswertung

Die Auswertung der Immunfluoreszenzanalysen erfolgte an einem konfokalen Leica TCS SP2 Mikroskop mittels Leica Confocal Software (Leica, Solms).

2.4.3 Verwendete Puffer und Lösungen

MTSB (Microtubule Stabilizing Buffer) 5x (in mM):

Na-PIPES (pH 6,9)	80
MgCl ₂ x6H ₂ O	1
Na-EGTA	1
Polyethylenglykol 6000	4%(v/v)
	ad 500 ml aqua bidest

Fixierungspuffer:

2% Paraformaldehyd in MTSB

Paraformaldehyd-Stocklösung: 10% Paraformaldehyd in H₂O (unter Abzug!)

Auf 50-60°C erhitzen und mit NaOH titrieren, bis die Lösung klar ist

Extraktionspuffer :

1% TritonX-100 (Merck, Darmstadt) in PBS

Blockpuffer:

5% BSA in PBS + 3% Ziegenserum (Invitrogen, Karlsruhe)

Puffer für die Antikörperinkubation:

1. Antikörper: PBS + 3% Ziegenserum + 1:50 Verdünnung HA High Affinity (Roche Biochemicals, Mannheim)

2. Antikörper: PBS + 3% Ziegenserum + 1:1000 Verdünnung Alexa Fluor 546 goat anti-rat IgG (Mo Bi Tec, Göttingen)

2.5 Mitochondriale Fluoreszenzfärbung

Mit Hilfe des MitoTracker Deep Red 633 (MoBiTec, Göttingen) wurden Mitochondrien im Rahmen einer Zwei-Kanal-Messung am konfokalen Mikroskop visualisiert. Der zellgängige Farbstoff enthält eine schwach Thiol-reaktive Chloromethyl-Gruppe, die nach Konjugation mit

Proteinen oder Peptiden nach der Fixierung mehrheitlich im Mitochondrien verbleibt. Der Farbstoff absorbiert bei 640nm und emittiert Licht einer wellenlänge von 662nm.

Um die Mitochondrien derart anzufärben, wurden die Zellen mit submikromolaren Konzentrationen des Mitotracker inkubiert. Die besten Ergebnisse lieferte eine 20minütige Behandlung der Zellen mit einer Endkonzentration von 200nM Mitotracker; geringere Konzentrationen des Mitotracker führten zu keiner detektierbaren Anfärbung der Mitochondrien. Bei den auf Coverslips herangewachsenen Zellen wurde dafür ein Mediumwechsel durchgeführt. Das alte Kulturmedium wurde abgesaugt und durch Kulturmedium mit Mitotracker in einer Endkonzentration von 200nM ersetzt. Danach wurden die Zellen für 20min in den Brutschrank zurück gestellt bevor mit der Immunfluoreszenzfärbung begonnen wurde. Eine Inkubationszeit kleiner 20min sollte nicht gewählt werden, da die Anfärbung sonst zu schwach ist.

2.6 Ca-Imaging (Fura-2AM-Assay)

Das Absorptionsspektrum des Fluorophors Fura-2 erfährt nach Bindung von Kalzium eine Spektralverschiebung der Anregungswellenlänge zu niedrigeren Wellenlängen, während die optimale Emissionswellenlänge mit 510nm gleich bleibt . Regt man im Wechsel den Farbstoff mit 340 und 380nm an, erhält man eine Aussage darüber, wie viel Fura-2 mit Ca^{2+} assoziiert ist, indem man das Intensitätsverhältnis des jeweils emittierten Fluoreszenzlichtes betrachtet (ratiometrische Fluoreszenzmessung). Auf diese Weise eliminiert man Farbstoff-spezifische Fehler wie ungleichmäßige Verteilung, Auslaufen oder Ausbleichen.

2.6.1 Vorbereitungen

Für das Ca-Imaging wurden TRex-HEK-293 Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen auf einem großen, runden Glasplättchen, 25 mm, (Menzel-Gläser, Braunschweig) in einer 35 mm Petrischale mit 2 ml Kulturmedium ausgesät. Zu diesem Zeitpunkt (etwa 24 Stunden vor Versuchsbeginn) wiesen die Zellen eine 80%ige Konfluenz auf.

Vor Versuchsbeginn wird das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit dem zellpermeablen Azetomethylester des fluoreszierenden Farbstoffs Fura2 (Molecular Probes, Mo Bi Tec, Göttingen) in HBS oder PBS beladen (Pufferzusammensetzung siehe 2.5.4). Der Farbstoff kann auf diese Weise in die Zelle gelangen, wo er im weiteren Verlauf zum Carboxylat-Anion hydrolysiert wird, welches die Zelle nicht mehr mittels Diffusion durch die Plasmamembran verlassen kann (Sammak *et al.*, 1992). Nach 1-1,5h lichtgeschützter Beladungszeit bei RT wurde das Medium wieder gegen frisches Medium ausgetauscht.

2.6.2 Durchführung

Der Glasplättchen wurden in einer Plastikhalterung mit 1ml Puffer überschichtet und in eine Temperatur-kontrollierte Inkubationskammer überführt, an der das Fluoreszenzmikroskop (IX

70, Olympus, Hamburg, Germany) angeschlossen war. Um die Hydrolyse des Azetomethyl-esters zu gewährleisten, werden die Zellen für 10min bei RT inkubiert.

Die Fluoreszenzintensitäten für beide Wellenlängen werden mit einem TILL Photonics Imaging System (TILL Photonics, Martinsried) bestimmt. Während der Messung wechselte die Anregungswellenlänge zwischen 340nm und 380nm. Emittiertes Licht mit einer Wellenlänge von 510nm wurde detektiert und der Hintergrund über die Software (TILLVision, Martinsried) korrigiert. Fluoreszenzintensitäten wurden in Intervallen von sechs Sekunden registriert. Gleichzeitig wurde mit einer Videokamera, die unter der Kontrolle der Vision-Software stand, das mikroskopierte Sichtfeld aufgenommen.

2.6.3 Verwendete Puffer und Lösungen

HBS (HEPES-Buffered Solution) pH=7,4

	(mM)
HEPES	25
NaCl	125
MgCl ₂ x6H ₂ O	1,2
KH ₂ PO ₄	1,2
CaCl ₂	1,2mM (oder EDTA 2mM)

Ladepuffer1:

HBS; 1,2mM Ca²⁺ mit 3µM Fura-2AM

Ladepuffer2:

PBS+/, 1,2mM Ca²⁺ mit 2µM Fura-2AM

Äquilibrierungspuffer1:

HBS mit 1,2mM Ca²⁺

Äquilibrierungspuffer2:

PBS+/,

Assay-Puffer1:

HBS mit 1,2mM Ca²⁺, 2mM EDTA oder Ca²⁺-frei

Assay Puffer2:

PBS+/, oder PBS -/, 2mM EDTA

2.7 Detektion und Identifizierung von Proteinen per SDS-PAGE

HEK293- bzw. CHO-Zellen wurden mit HA-gekoppelten MaxiK- $\alpha\Delta S8$ bzw. -wt-Vektorkonstrukten transient transfiziert und in reduzierenden oder nicht-reduzierenden Puffer (mit 1% Triton X-100) lysiert. Die Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese getrennt und mit Hilfe des Nasstank-Blotverfahrens auf eine Nitrocellulosemembran (BioTrace, IUL Instruments GmbH, Königswinter) überführt. Nach Inkubation der Membranen mit Primärantikörpern (0,1 μ g/ml Anti HA high Affinity monoklonaler Antikörper aus der Ratte, Roche Biochemicals, Mannheim) und Sekundärantikörpern (0,8 μ g/ml Alexa Fluor 680 Anti Ratte IgG aus Ziege, MoBiTec, Göttingen) wurden die Kanalkomplexe mit einem Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences GmbH, Bad Homburg) detektiert. Gelelektrophorese (lineares Gel), Blotting und Immunfärbung der Membran wurden freundlicherweise von Herrn Dipl. Biol. Florian Bundis durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des Testsystems CHO-Trex-BK- α + β_1

Zur Identifizierung von Substanzen, die infolge einer spezifischen MaxiK-Aktivierung vasodilatierend wirken und damit therapeutisch zur Bekämpfung des Bluthochdrucks eingesetzt werden können, wurde ein Testsystem benötigt, welches die strukturellen und funktionellen Eigenschaften des nativen Kanalproteins möglichst genau widerspiegelt. Gleichzeitig musste dieses System derart beschaffen sein, dass mit industriellen Hochdurchsatz-Screening-Verfahren die Testung ausgedehnter Substanzbibliotheken auf den MaxiK Kanal ermöglicht werden konnte.

Letztere Bedingung wurde durch die heterologe Expression in einer standardisierten Zelllinie erfüllt (CHO- und HEK293-Zellen). Obwohl der Einsatz intakter Zellsysteme aufgrund ihrer Komplexität eine besondere Herausforderung an Hochdurchsatzverfahren darstellt, sind Ionenkanalassays bislang an die Verwendung von kultivierten Zellen geknüpft, da die lipophilen Kanalproteine in wässriger Lösung keinen funktionellen Verband bilden.

Die erste Bedingung wurde dadurch erfüllt, dass sowohl die MaxiK- α - als auch die β_1 -Untereinheit im Testsystem verwendet wurden. Wie bereits zuvor beschrieben, stellt diese Kombination von Untereinheiten das molekulare Korrelat des vaskulären MaxiK-Kanals dar.

Bei der Etablierung von Zelllinien, welche sowohl die α - als auch die β_1 -Untereinheit des vaskulären MaxiK Kanals stabil enthielten, wurden zunächst Zellklone generiert, die beide Proteine konstitutiv unter der Kontrolle viraler Promotoren exprimierten. Im Laufe der Kultivierung musste jedoch festgestellt werden, dass die Überexpression dieser Proteine toxisch auf die Zellen wirkte. Ein reproduzierbares Testsystem war auf diese Weise nicht herstellbar. Von den Alternativen, entweder die Expressionsrate der Proteine zu reduzieren oder die Expression erst kurz vor der Testdurchführung zu induzieren, wurde letztere Möglichkeit gewählt und mit Hilfe des TRex-Systems verwirklicht. Wie in 2.4.2.1. näher erläutert, wird in diesem System ein Zellklon generiert, welcher die kodierenden Bereiche des α - und β_1 -MaxiK-Proteins enthält, diese aber nicht transkribiert. Diese Zellen können permanent in Kultur gehalten werden, ohne ihre Eigenschaften zu verändern. Erst durch Zugabe von Tetrazyklin bzw. Doxzyklin wird die Transkription induziert. In einem Zeitraum von 15-24 Stunden erreicht die Expression ein Maximum und der Aktivitätstest wird innerhalb dieses Zeitfensters durchgeführt.

Unter Verwendung dieser induzierbaren Systeme wurden durch die Abteilung "Assay Technologies" die stabilen Zelllinien CHO-TREx-MaxiK- $\alpha+\beta_1$ und HEK293-TREx-MaxiK- $\alpha+\beta_1$ generiert. Im Anschluss an die regulierbare Promotorkassette enthielt das zur Herstellung der Zelllinien verwendete Plasmidkonstrukt die cDNS der MaxiK α - und β_1 - Untereinheiten in einer Tandemanordnung. Um eine Translation beider Untereinheiten zu gewährleisten, wurde vor die hintere kodierende α -Sequenz eine IRES-Region (IRES, engl. internal ribosome entry site) eingefügt. Diese Sequenz interagiert mit ribosomalen Strukturen, so dass auch die zweite mRNA translatiert wird und funktionelle Kanäle gebildet werden (Lippiat *et al.*, 2003). Auf diese Weise können von nur einem Plasmidkonstrukt zwei Proteine in der Zelle exprimiert werden.

Zunächst musste nun getestet werden, ob mit dem beschriebenen Ansatz tatsächlich ein funktioneller Ionenkanal mit den Eigenschaften des vaskulären MaxiK Kanals exprimiert werden konnte. Um diese Frage zu klären, wurden elektrophysiologische Messungen an CHO-TREx-BK- $\alpha+\beta_1$ und HEK293-TREx-BK- $\alpha+\beta_1$ durchgeführt. Da für das Hochdurchsatz-Screening der CHO-TREx-BK- $\alpha+\beta_1$ Zellklon interessanter erschien, wurde die detaillierte elektrophysiologische Analyse ebenfalls an diesen Zellen durchgeführt; der HEK293-Klon wurde nur dann verwendet, wenn es die Versuchsbedingungen verlangten (siehe 3.1.7)

3.1.1 Elektrophysiologische Charakterisierung des CHO-TREx-BK- $\alpha+\beta_1$ -Klons

3.1.1.1 MaxiK-vermittelte Auswärtsströme in der Ganzzell-Konfiguration

80.000 CHO-TREx-BK- $\alpha+\beta_1$ -Zellen wurden 24h vor Beginn der Messungen auf Glasplättchen plattiert und in diesem Zeitraum im Brutschrank nach Zugabe von Doxzyklin aufbewahrt (siehe 2.3.1.4). Als Kontrollzelllinie diente der parentale CHO-TREx-wt Zellklon. Die Messungen erfolgten in der Ganzzell-Konfiguration, wobei die Pipetten- und Badlösung Kaliumionen in physiologischen Konzentrationen enthielt. Die genaue Zusammensetzung der Lösungen ist in Kapitel 2.3.1.7 angegeben.

Um die Strom-Spannungs-Charakteristik von Ganzzellströmen in transfizierten und Kontrollzellen zu bestimmen, wurden ausgehend von einer Haltespannung von -80mV 200ms lange Spannungssprünge appliziert (siehe Pulsprotokoll in Abb.5). Die Depolarisation wurde dabei sukzessive erhöht; der Abstand zwischen den einzelnen Sprüngen lag bei jeweils 20mV , so dass bei Verwendung von acht Spannungssprüngen ein maximales Potential von $-80 + (8 \times 20) = +80\text{mV}$ erzeugt wurde.

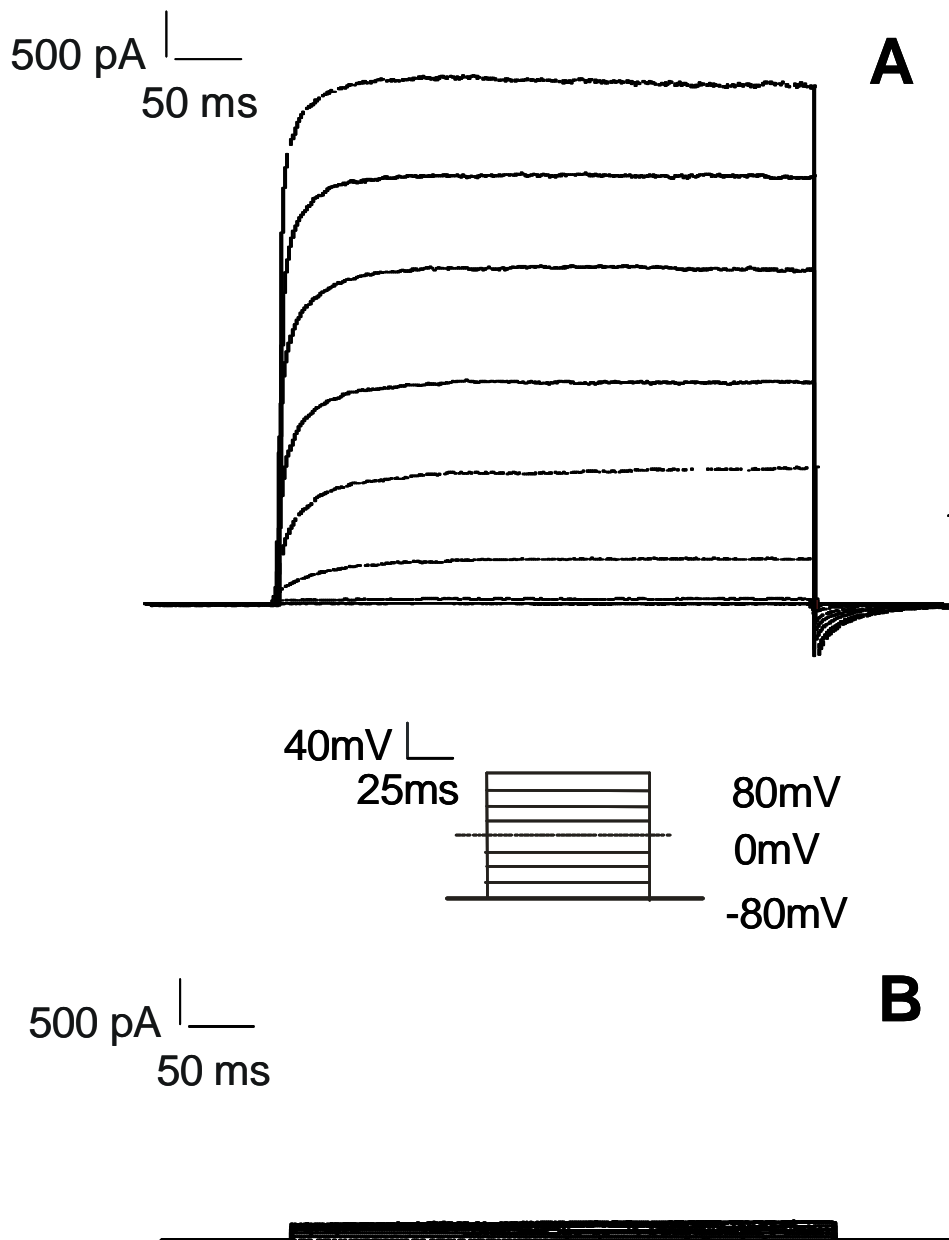


Abb. 5: MaxiK-v ermittelte Kaliumströme in stabil transfizierten CHO-Trex-BK- $\alpha+\beta_1$ -Zellen. Dargestellt ist eine repräsentative Patch-Clamp-Analyse in der Ganzzell-Konfiguration. Meßmethode und -Puffer sind in 2.3.1 beschrieben. Ausgehend von einem Haltepotential von -80mV erfolgten schrittweise Sprünge um $+20\text{mV}$; die höchste Depolarisation betrug $+80\text{mV}$ (siehe mittig eingefügtes Pulsprotokoll). Analog zum Pulsprotokoll sind die Stromspuren überlagert im Diagramm dargestellt. Die Depolarisationsdauer betrug jeweils 200ms . **(A)** Auswärtsströme in CHO-Trex-MaxiK- $\alpha+\beta_1$. **(B)** Auswärtsströme in CHO-wt. Der Übersichtlichkeit halber sind die Stromamplituden des Wildtyps um den Faktor 10 vergrößert dargestellt.

Wie Abb.5A verdeutlicht, wurden im Falle der stabil transfizierten Zelllinie bei +80mV Auswärtsströme im Nanoampere-Bereich ($5,81 \pm 1,68 \text{ nA}$, $n=6$) registriert. Stromkinetik sowie Spannungsabhängigkeit entsprechen den in der Literatur beschriebenen Werten für MaxiK Kanäle (Lippiat *et al.*, 2003). Dagegen zeigte die Parentalzelllinie bei +80mV nur Auswärtsströme im Picoampere-Bereich ($0,13 \pm 0,03 \text{ nA}$, $n=6$; siehe Abb.5B). Die drastisch erhöhte Auswärtsleitfähigkeit, die unter den gegebenen Bedingungen durch Kaliumionen getragen wird, spricht für eine funktionelle Expression des MaxiK Kanals.

3.1.1.2 Die Doxyzyklin-abhängige Induktion von MaxiK-vermittelten Kaliumströmen

Die Induktion der Genexpression im TRex-System erfolgt durch Zugabe des Antibiotikums Tetrazyklin bzw. seines Analogs Doxyzyklin. Auch ohne Doxyzyklin-Inkubation konnten in den CHO-Trex-BK- $\alpha+\beta_1$ Zellen signifikant höhere Kaliumströme gemessen werden als in Wildtyp-Zellen (siehe 3.1.1.1). Dieses Phänomen kann durch eine unvollständige Inhibition der tetrazyklinabhängigen Transkription durch das Tet-Repressor Protein erklärt werden. Wie in Abb.6 gezeigt, konnte die Kaliumleitfähigkeit in CHO-Trex-MaxiK- $\alpha+\beta_1$ -Zellen durch Zugabe von $1 \mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin gegenüber nicht stimulierten Zellen nochmals deutlich gesteigert werden. Doxyzyklin-behandelte Zellen zeigten im Mittel eine Stromamplitude von $35,25 \pm 2,34 \text{ nA}$. Bei diesen hohen Strömen können selbst bei sorgfältiger Kompensation des Zugriffswiderstandes R_s Spannungsklemmenartefakte nicht ausgeschlossen werden.

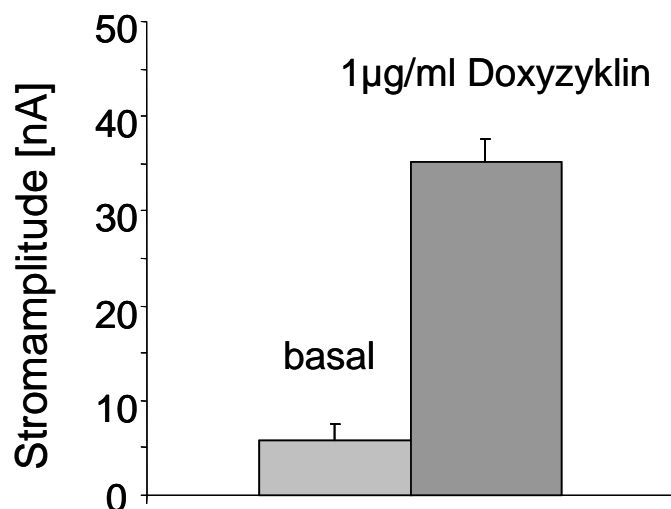


Abb. 6: Induzierbarkeit MaxiK-vermittelter Kaliumströme in stabil transfizierten CHO-Trex-Bk- $\alpha+\beta_1$ -Zellen durch $1 \mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin. Dargestellt sind die mittleren Stromamplituden als Antwort auf eine Membrandepolarisation von -80 auf $+80 \text{ mV}$ in der Ganzzell-Konfiguration (basal, $n=6$; induziert, $n=8$).

Falls nicht anders angegeben wurden daher für die weitere pharmakologische Charakterisierung nicht-induzierte CHO-Trex-MaxiK- $\alpha+\beta_1$ Zellen verwendet, deren Stromamplituden sich

deutlich von den Parentalzellen unterscheiden, dabei aber gleichzeitig einwandfreie Spannungsklemmen-Experimente erlauben.

3.1.1.3 Inhibition MaxiK-vermittelter Kaliumströme

Um nachzuweisen, dass die erhöhte Kaliumleitfähigkeit in CHO-Trex-BK- α + β_1 Zellen durch MaxiK Kanäle vermittelt wird, wurden Versuche mit dem spezifischen Inhibitor Paxillin durchgeführt (Knaus *et al.*, 1994c). Wie Abb.7 beschreibt, verringerte 1 μ M des Indolalkaloids Kaliumströme, die durch Potentialsprünge von -80 auf $+80$ mV in 20mV-Schritten ausgelöst wurde, um mehr als 98% ($98,1 \pm 5,4\%$, $n=3$ bei $+80$ mV). Der Effekt ist irreversibel, da eine fünfminütige Perfusion mit Inhibitor-freiem Messpuffer keine Erholung des Auswärtsstroms zur Folge hatte. Diese Eigenschaft des Paxillins wird in der Literatur ebenfalls beschrieben.

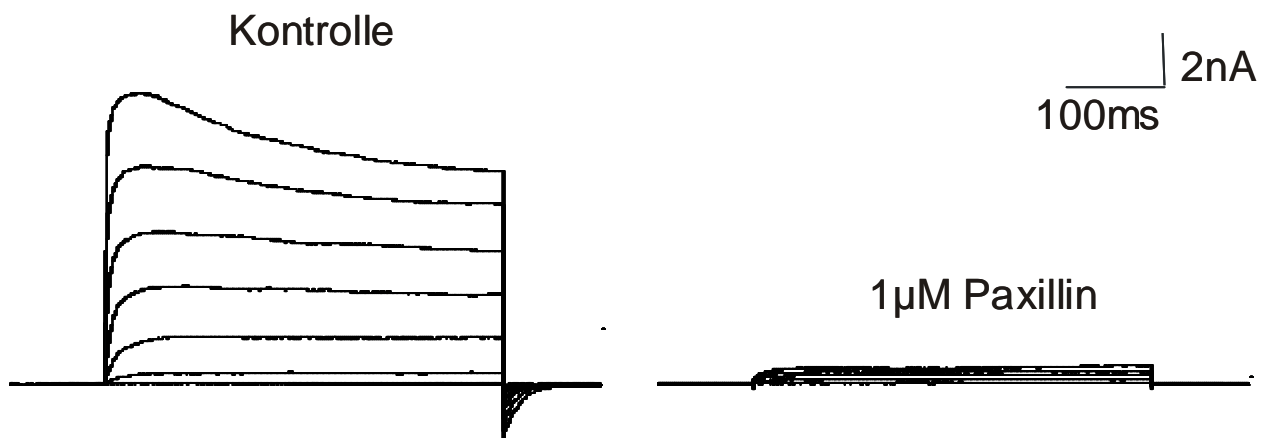


Abb. 7: Inhibition MaxiK-vermittelter Kaliumströme in CHO-Trex-MaxiK- α + β_1 -Zellen durch 1 μ M Paxillin. Dargestellt ist eine repräsentative Patch-Clamp-Analyse in der Ganzzell-Konfiguration. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV erfolgten schrittweise Sprünge um $+20$ mV bis zu einem Maximalpotential von $+80$ mV. In der Abbildung sind nur die resultierenden Kaliumauswärtsströme dieser Potentialsprünge dargestellt.

Auch Iberiotoxin, ein spezifisches Peptidtoxin aus dem Skorpion *Buthus tamulus* (Candia *et al.*, 1992), hemmte in einer Konzentration von 300nM MaxiK-vermittelte Kaliumströme in den CHO-Zellen zu 80% (S. Müller, unveröffentlicht), so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die gemessenen Kalium-Auswärtsströme funktionell den beschriebenen MaxiK Kanälen zugeordnet werden konnten.

3.1.2 Funktioneller Nachweis der MaxiK- β_1 -Untereinheit

Die soeben beschriebenen Experimente mit spezifischen Inhibitoren der BK- α -Untereinheit lassen auf eine funktionelle Expression der porenbildenden MaxiK Untereinheit schließen. In den folgenden Experimenten ging es nun darum, auch die regulatorische β_1 -Untereinheit nachzuweisen. Es ist beschrieben worden (Brenner *et al.*, 2000a), dass die Anwesenheit der β_1 -Untereinheit die Aktivierung des MaxiK-Stroms verlangsamt. Die Kinetik der in Abb.1 dar-

gestellten Stromantwort auf die Membrandepolarisation entspricht im wesentlichen den Angaben aus der Literatur für MaxiK- α + β_1 exprimierende Zellen. Eine ausführliche Analyse der kinetischen Stromparameter wurde in dieser Arbeit allerdings nicht durchgeführt, da hierfür ein Vergleich mit den entsprechenden MaxiK- α -Kontrollzellen nötig wäre. Der Nachweis, dass die β_1 -Untereinheit im funktionellen Kanal entsprechend den *in vivo*-Verhältnissen vorliegt, wurde in den folgenden Experimenten erbracht.

3.1.2.1 Die Kalzium-abhängige Aktivierung

Das Ca^{2+} -Ion führt als intrazellulärer Ligand zu einer Aktivierung des MaxiK Kanals, die sich in einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals äußert. Die Anwesenheit des β_1 -Proteins im funktionellen Heteromer erhöht die Ca^{2+} -Sensitivität des Kanals und führt zu einer Linksverschiebung der Strom-Spannungskennlinie (Dworetzky *et al.*, 1996). Daher wurde im nächsten Versuch die Kalzium-Abhängigkeit von MaxiK-Strömen im vorliegenden Modell näher untersucht.

Um einen möglichst störungsfreien Zugang zum Zellinneren zu erhalten, wurde durch das ruckartige Abziehen der Messpipette nach dem Ansaugschritt der unter der Pipettenöffnung verbleibende Membranfleck elektrophysiologisch charakterisiert. Dieses Verfahren wird als excised-patch bezeichnet und stellt eine „inside-out“-Konfiguration dar (siehe 2.3.1.6), da nun die Intrazellulärseite der Plasmamembran dem Messbad zugewandt ist.

In der Badlösung wurden durch Titration von Ca^{2+} mit EGTA 100nM bzw. 100 μM freies Kalzium vorgelegt und die resultierenden Auswärtsströme in Abhängigkeit von der angelegten Kommandospannung miteinander verglichen (siehe Abb.8). Im Gegensatz zu Abb.1 sind in diesem Falle die Spitzenströme gegen die jeweiligen Spannungsströme (als Potentiale) in Form der sogenannten IV-Relation aufgetragen, wobei sie aus Gründen der Übersichtlichkeit mit dem jeweiligen Spitzenstrom der stärksten Depolarisation normalisiert wurden.

Die linke Kurve beschreibt den sigmoiden Verlauf einer IV-Beziehung mit hohem Hill-Koeffizient und damit einer ausgeprägten Kooperativität.

Unter Verwendung von 100 μM Kalzium wurde bei etwa +60mV der maximale Auswärtsstrom registriert; der Wert des halb-maximalen Stroms wurde bei -5mV erreicht.

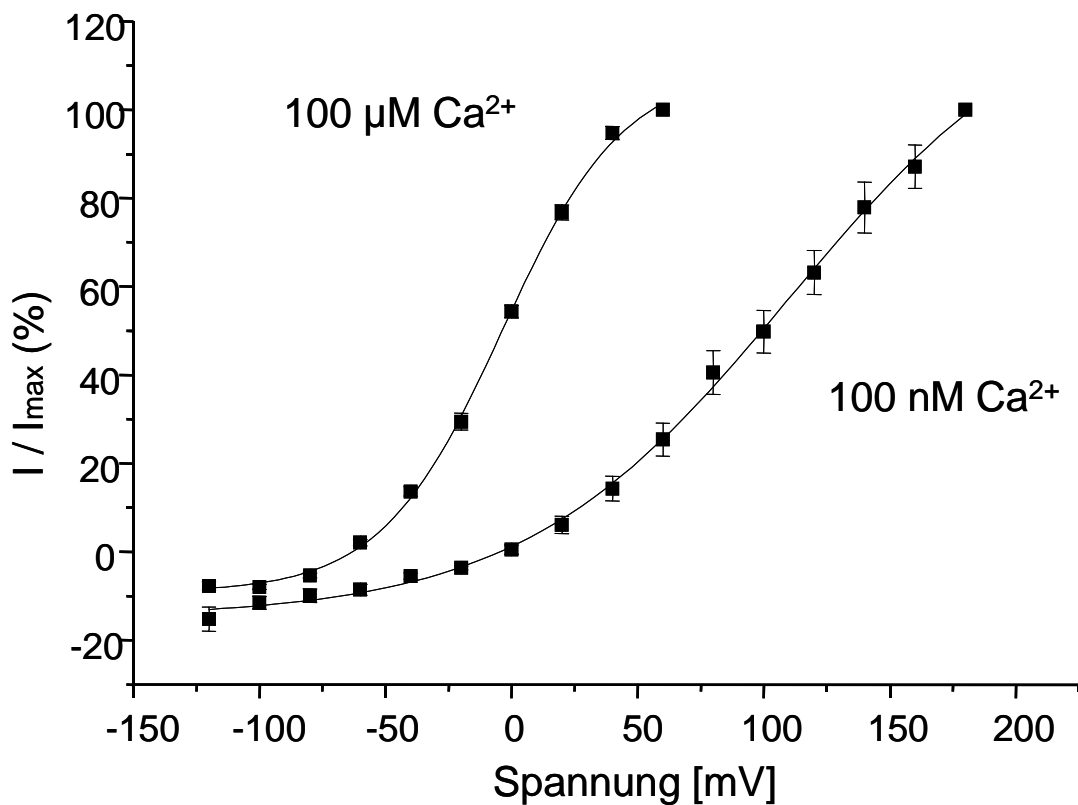


Abb. 8: Kalzium-Abhängigkeit der Strom-Spannungskurve von CHO-Trex-MaxiK- α + β ₁. Dargestellt sind die I-V-Relationen in Anwesenheit von 100 μ M (linke Kurve) bzw. 100nM Ca²⁺ (rechte Kurve). Die Stromamplituden wurden in der inside-out-Konfiguration registriert; Messprinzip und -puffer sind in 2.2.1 näher beschrieben. Die registrierten Auswärtsströme wurden jeweils durch den Strom bei der höchsten Depolarisation normalisiert, und die Werte sind mit ihrem mittleren Fehler (\pm SEM) dargestellt.

Im Gegensatz dazu ist in Anwesenheit von 100nM Kalzium die IV-Relation zu positiveren Potentialen hin verschoben. Diese Konzentration entspricht in etwa der, die intrazellulär vorliegt, wenn keine signalaktiven Prozesse unter Beteiligung des Kations stattfinden (Harnett & Biancani, 2003). Unter diesen Bedingungen zeigt die IV-Relation im Bereich >0 mV einen annähernd linearen Verlauf, der zwar bei +180mV noch keinen Plateaustrom aufweist, jedoch in eine Sättigung übergeht. Der $V_{1/2}$ -Wert, das heißt, das Potential, bei dem die Hälfte des maximalen Auswärtsstroms registriert wurde, liegt unter diesen Bedingungen bei etwa 102mV. Die Asymmetrie zwischen negativen und positiven Potentialbereich lässt eine spannungs-vermittelte Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit vermuten, wie es MaxiK Kanäle auch in Abb.1 zeigten.

In akzeptabler Übereinstimmung mit dieser Untersuchung ermittelten Lippiat und Kollegen in Gegenwart von 300nM Ca²⁺ für heterolog in HEK293-Zellen exprimierte α - und β ₁-Proteinen

einen $V_{1/2}$ -Wert von 100mV⁶, wohingegen im Falle der Expression von α alleine bei Verwendung von 1 μ M Kalzium der $V_{1/2}$ -Wert etwa 120 mV betrug (Lippiat *et al.*, 2003). Daraus kann geschlossen werden, dass die β_1 -Untereinheit die funktionellen Eigenschaften des MaxiK Kanals in den generierten CHO-Zellen beeinflusst.

Kalzium führt also zu einer drastischen Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit des exprimierten Heteromers in CHO-Zellen. Die Anwesenheit der β_1 -Untereinheit verstärkt diesen Effekt. Daher könnte dieses Experiment als Beleg für die funktionelle Interaktion von α - und β_1 -Proteinen gewertet werden.

3.1.2.2 Die Dehydrosoyasaponin-I-vermittelte Aktivierung

Dehydrosoyasaponin-I (DHS-I, siehe Abb.9) ist ein Triterpen-Glykosid aus *Desmodium ascendens* (Amor Seco), einer tropischen Heilpflanze, die in Westafrika und Lateinamerika zur Bekämpfung von Asthma (Ghana), Koliken oder Schmerzen (Brasilien) eingesetzt wird.

McManus *et al.* wiesen nach (McManus *et al.*, 1993), dass dieser Naturstoff die Offenwahrscheinlichkeit vaskulärer MaxiK Kanäle erhöht, wenn er auf der intrazellulären Seite appliziert wird. Diese Aktivität ist β_1 -vermittelt, da DHS-I in geringen Konzentration einen α -homomeren Kanalkomplex nicht aktiviert (McManus *et al.*, 1995).

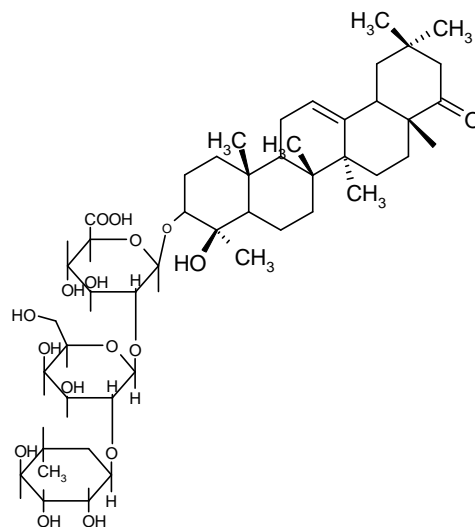


Abb. 9: Chemische Struktur des Dehydrosoyasaponin-I.

⁶ Der Diskrepanz könnte das verwendete Expressionssystem zugrunde liegen; eigene Messungen erbrachten für die generierten HEK293-TREx-MaxiK- α + β_1 -Zellen einen $V_{1/2}$ -Wert von 70mV bei Verwendung von 100nM Kalzium (Daten hier nicht gezeigt).

Im folgenden wurde untersucht, ob DHS-I im Zellsystem CHO-TRex-MaxiK- α + β 1 eine Erhöhung der Stromamplitude verursacht. Dazu wurde die inside-out-Konfiguration unter Verwendung von 100nM Kalzium in der Badlösung eingesetzt. 1 μ M DHS-I wurde in die Badlösung gegeben und Spannungsrampen mit einer Frequenz von 0,1Hz durchgeführt, in deren Verlauf das Membranpotential innerhalb von 300ms von -80 auf +80mV depolarisiert wurde. Eine repräsentative Stromantwort ist in Abb.10 dargestellt:

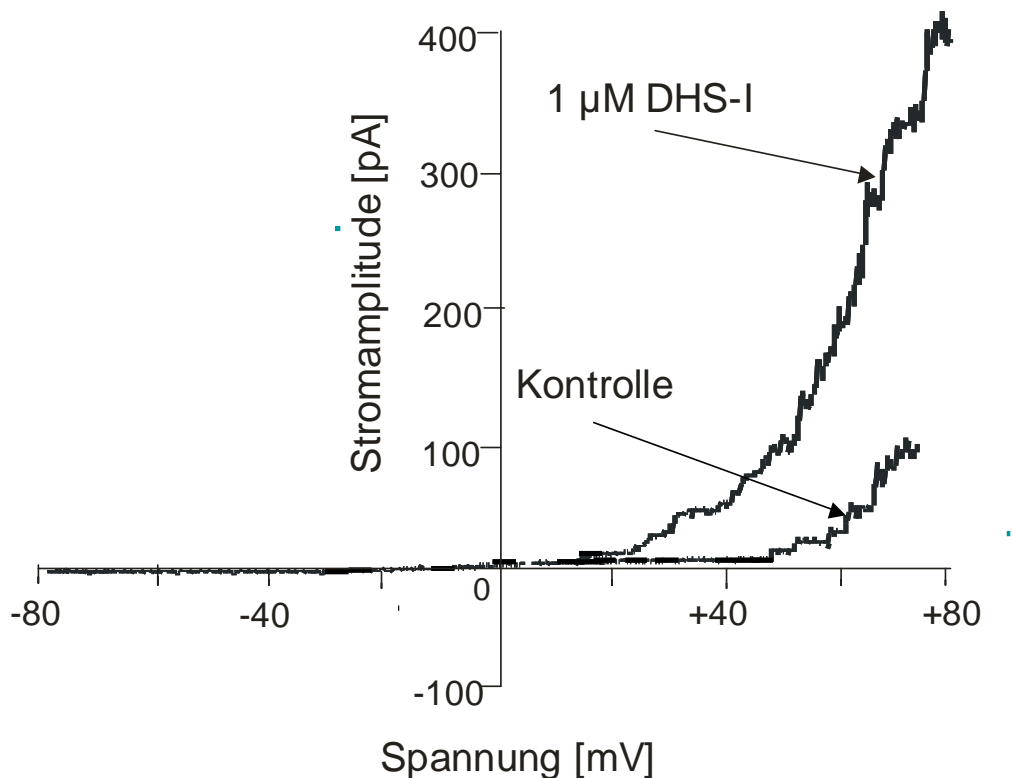


Abb. 10: Aktivierung von MaxiK-vermittelten Kaliumströmen durch Dehydrosoyasaponin-I in CHO-TRex-MaxiK α + β ₁-Zellen. Dargestellt sind repräsentative Ströme als Folge einer Spannungsrampe (300ms) von -80 auf +80mV vor (Kontrolle) und nach Zugabe von 1 μ M DHS-I. Die Messung erfolgte in der inside-out-Konfiguration.

Die Zugabe von 1 μ M DHS-I führte zu einer Vervierfachung des Kalium-Auswärtsstroms ($414\pm 31\%$, $n=4$ bei +80mV). Dies ist ein eindeutiger Beleg für die Anwesenheit von β ₁-Untereinheiten im multimeren MaxiK Kanalkomplex.

Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass in CHO-MaxiK- α , β ₁-Zellen ein funktionell aktiver MaxiK Kanal existiert, der aus α - und β ₁-Untereinheiten besteht und daher dem vaskulären MaxiK Kanal nach heutigem Kenntnisstand entspricht.

3.1.3 Die pH-Abhängigkeit

Eine Absenkung des intrazellulären pH-Wertes vom physiologischen Bereich zu sauren Werten hin ($\text{pH} \leq 6,0$) erniedrigt die MaxiK-Aktivität. Die halbmaximale Aktivierungsspannung ist zu positiveren Potentialen hin verschoben, da die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals abnimmt (Andersen *et al.*, 1995; Church *et al.*, 1998).

Die Charakterisierung dieses Effektes erfolgte, da sich bei der Etablierung des HTS-Assays eine Absenkung des pH als vorteilhaft erwiesen hatte. Zu diesem Zwecke wurde wieder die inside-out-Konfiguration gewählt, da die pH-Änderung nur auf der intrazellulären Seite des Kanals zu einer Inhibition führt.

Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass MaxiK-vermittelte Auswärtsströme bei Azidifizierung der Zelle abnehmen (siehe Abb.11, $n=6$). Dies gilt auch für die wesentlich kleineren Kaliumströme der Wildtyp-CHO-TREx Zellen, die fast komplett inhibiert wurden ($n=6$). Diese Beobachtung könnte die Grundlage dafür sein, dass bei $\text{pH} 5,4$ in dem auf einer Membranpotentialmessung beruhenden HTS-Assay weniger unspezifische Signale detektiert wurden.

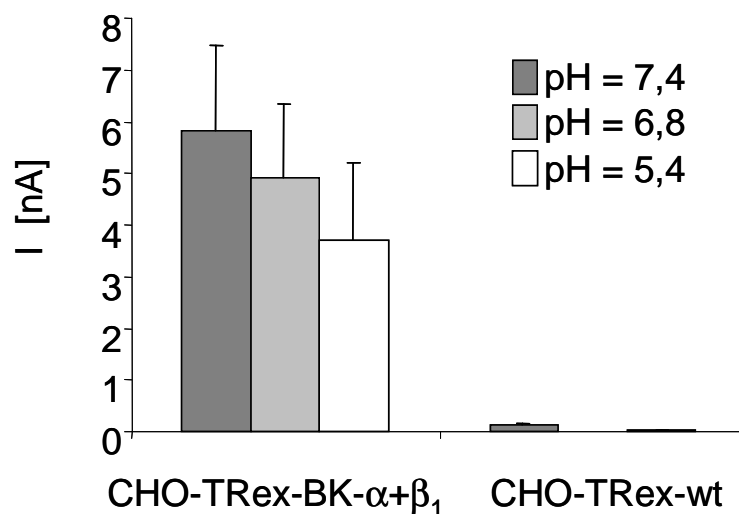


Abb. 11: pH-Abhängigkeit MaxiK-vermittelter Kaliumströme in CHO-TREx-BK- $\alpha+\beta_1$ -Zellen und der Parentalzelllinie CHO-TREx-wt. Dargestellt sind Spitzenströme, die durch eine Spannungsrampe von -80 auf $+80\text{mV}$ hervorgerufen wurden. Die Messung erfolgte in der inside-out-Konfiguration; Fehler sind als $\pm\text{SEM}$ berechnet. Dargestellt ist ein Vergleich der mittleren Auswärtsströme zwischen beiden Zell-Klonen bei $\text{pH} 5,4$ sowie $6,8$ (keine Daten zum Wildtyp) und $7,4$.

Abschließend bleibt festzustellen, dass das induzierbare CHO-TREx-BK- $\alpha+\beta_1$ -System den Ansprüchen an ein taugliches Testsystem zumindest aus elektrophysiologischer Sicht voll genügt. Der vaskuläre MaxiK Kanal wird funktionell exprimiert, und die beschriebenen Effekte decken sich mit den Angaben aus der Literatur. Um den Primärassay aufzubauen und in automatisierter Form durchzuführen, wurde jedoch noch eine geeignete niedermolekulare Referenzsubstanz benötigt.

3.1.4 Untersuchungen zur Pharmakologie von direkten Aktivatoren des MaxiK Kanals in *Xenopus laevis* Oozyten

Da durch die Wahl des Expressionssystems *Xenopus laevis* Oozyte ein höherer Proben-durchsatz im Vergleich mit der Patch Clamp-Analyse an Säugerzellen erzielt werden kann, wurden bekannte Aktivatoren des MaxiK Kanals mit der TEVC-Methode in diesem System charakterisiert⁷.

Zunächst wurden 17- β -Estradiol (Valverde *et al.*, 1999) und Tamoxifen (Dick *et al.*, 2001) in der Oozyte bezüglich ihrer in der Literatur beschriebenen aktivierenden Eigenschaften auf den MaxiK Kanal getestet. Mit beiden Substanzen konnte jedoch kein reproduzierbarer Effekt, wie er für den Aufbau eines Assays unumgänglich ist, erzielt werden. Da es umstritten ist, ob die MaxiK-Aktivierung direkt durch Östrogen oder durch die entsprechenden Hormonrezeptoren reguliert wird, wurde im folgenden eine Substanzbank, die Modulatoren des Östrogenrezeptors (SERM, engl. selective estrogen receptor modulators) enthielt, durchmustert. Auch in diesem Fall konnte keine Referenzsubstanz zweifelsfrei ermittelt werden.

Die Benzimidazolonderivate mit dem wohl bekanntesten Vertreter NS1619 (siehe Abb.12) konnten den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen ebenfalls nicht gerecht werden. 10 μ M NS1619 lieferte mit 19 \pm 21% Aktivierung (n=3) bei koexprimierten BK- α + β ₁ noch die besten Ergebnisse. Hinzu kam, dass bei sämtlichen gemessenen Benzimidazolonen bereits ein aktivierender Effekt auf die α -Untereinheit alleine detektiert wurde, so bei 10 μ M NS1619 mit 31 \pm 17% (n=3) sogar eine höhere Aktivierung gegenüber der Koexpression.

Deutliche Stromamplitudenerhöhungen gelangen dagegen mit Pimarinsäure und CGS7181. 10 μ M Pimarinsäure führten zu einer 3-4fachen Zunahme der Stromamplitude (436 \pm 24% bei +80mV, n=4). 10 μ M CGS7181 aktivierten im Falle der Expression von BK- α eine Stromzunahme um 289,5 \pm 23,9% (n=11, A. Hertler, unveröffentlicht); im Gegensatz dazu besaß die Substanz eine sehr große Spannbreite bezüglich ihrer aktivierenden Eigenschaften, wenn α - und β ₁-Protein in Oozyten exprimiert wurden. So betrug die Zunahme der Stromamplitude bei +80mV unter Verwendung von 10 μ M zwischen 267 und 1490% (n=12). Die Gründe dafür könnten im Meßsystem zu suchen sein; in Oozyten ist die Kontrolle der effektiven Ca²⁺-Konzentration erschwert, sodass kaum Aussagen über diesen Koaktivator des BK Kanals getroffen werden können. Aus diesem Grund wurde nun dazu übergegangen, BK-Kanäle im etablierten Testsystem CHO-TREx-MaxiK- α + β ₁ näher zu untersuchen.

⁷ Darüber hinaus ist neben der Suche nach einer geeigneten Testsubstanz diese „rationale“ Wirkstoffsuche trotz der generalisierten Hochdurchsatz-Strategie nicht zu vernachlässigen, da es durchaus vorkommen kann, dass potente Verbindungen nicht Bestandteil einer firmeninternen Substanzbibliothek darstellen.

3.1.5 Analyse der Kanalaktivierung durch CGS7181

Im Vergleich mit anderen MaxiK Aktivatoren, die in den letzten Jahren publiziert wurden, besitzt CGS7181 (Abb. 12) die höchste Aktivität innerhalb der Arylbenzimidazole bzw. Arylindolylharnstoffe (Hu *et al.*, 1997). Mit seinen Biarylen, die durch einen Heterozyklus bzw. durch eine Harnstoffbrücke voneinander getrennt sind, stellt es darüber hinaus einen vielversprechenden Synthese-Ansatzpunkt dar (Calderone, 2002).

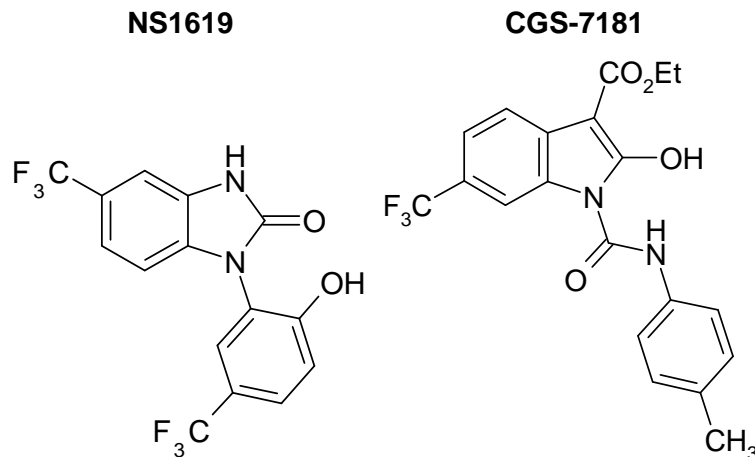


Abb. 12: Strukturvergleich synthetisch hergestellter MaxiK-Aktivatoren.

3.1.5.1 Elektrophysiologische Messungen an CHO-TREx-MaxiK- $\alpha+\beta_1$ -Zellen

Die aktivierende Wirkung von GCS7181 wurde zunächst in der Ganzzelleableitung bestimmt. 10 μ M erhöhten den MaxiK-vermittelten Kaliumstrom, der als Antwort auf eine Spannungsrampe von -80 nach $+80$ mV gemessen wurde, um $685\pm 40\%$ (bei $+80$ mV, siehe Abb.13+14).

Um sicherzustellen, dass dieser Effekt auf einer direkten Wechselwirkung mit dem Kanal beruht und um Spannungsklemmenartefakte auszuschliessen, wurde im Anschluss die Aktivität in der inside-out-Konfiguration gemessen. Dazu wurde die Substanz in verschiedenen Konzentrationen ins Bad appliziert; nach etwa einer Minute konnte eine Erhöhung des Auswärtsstromes registriert werden. Die Dosis-Wirkungskurve ist in Abb.14 dargestellt: CGS7181 führt zu einer starken Aktivierung des MaxiK-vermittelten Auswärtsstromes in CHO-TREx-MaxiK- $\alpha+\beta_1$ -Zellen. Die Kurve weist einen hohen Hill-Koeffizienten auf, die halbmaximale Aktivatorkonzentration wurde anhand dieses Experimentes mit $EC_{50} = 8,6\pm 0,4\mu$ M berechnet.

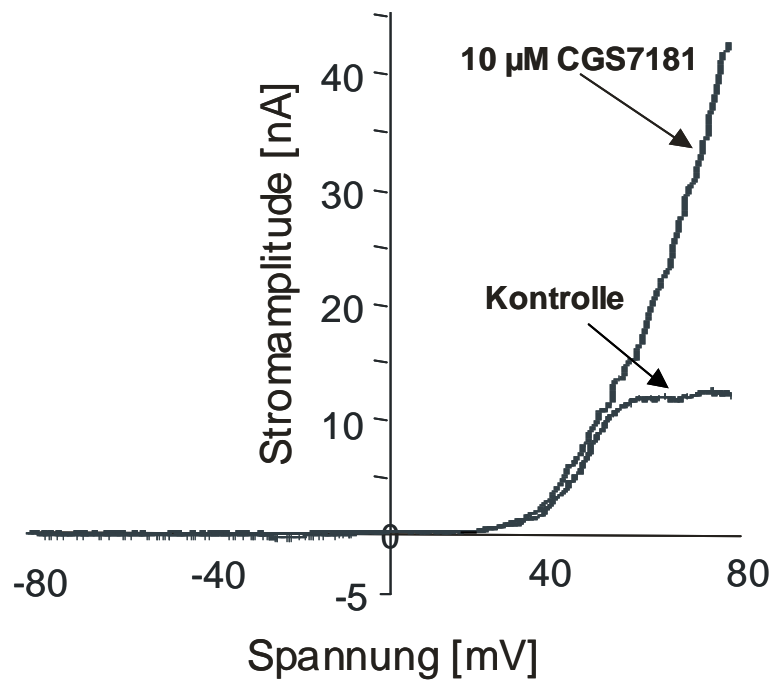


Abb. 13: Aktivierung durch 10 μM CGS7181 von MaxiK-vermittelten Kaliumströmen in CHO-TRex-MaxiK-α+β₁-Zellen in der Ganzzell-Ableitung. Dargestellt sind jeweils repräsentative Stromspuren vor (Kontrolle) und nach der Aktivierung im zeitlichen Verlauf der Spannungsrampe (Haltepotential bei -80, auf +80 mV geändert).

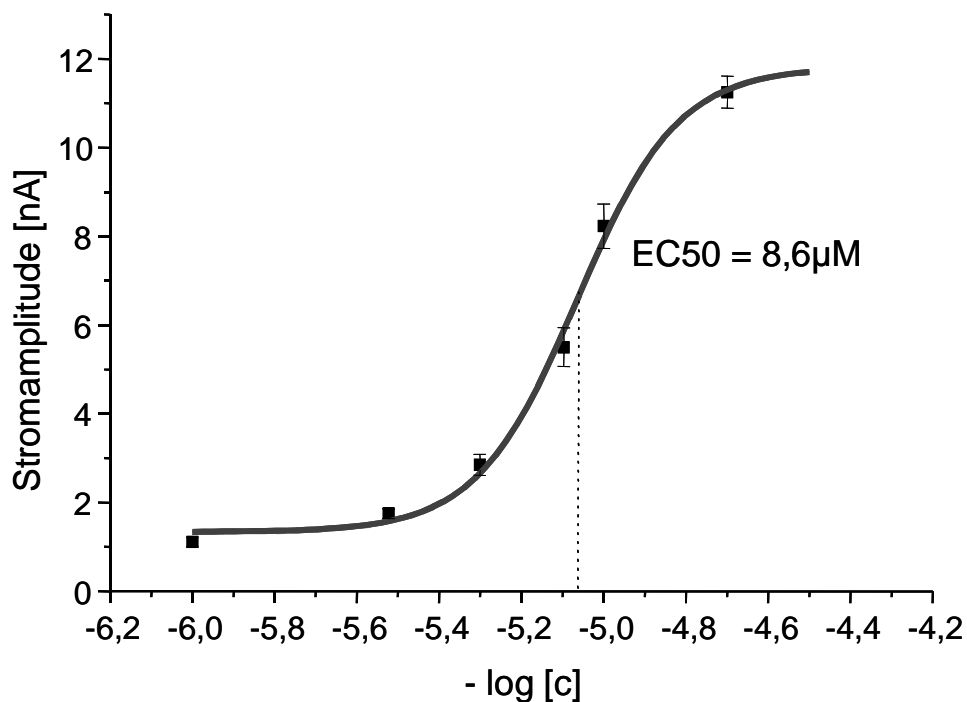


Abb. 14: Dosis-Wirkungskurve der Aktivierung MaxiK-vermittelter Kaliumströme durch CGS7181 in CHO-TRex-MaxiK-α+β₁-Zellen in der inside-out-Konfiguration. Registriert wurden Spitzenströme, die durch eine Spannungsrampe von -80 auf +80mV hervorgerufen wurden; die ermittelte Stromamplitude (± SEM) ist in Abhängigkeit von der Konzentration im logarithmischen Maßstab dargestellt.

3.1.5.2 Ratiometrische Fluoreszenzuntersuchungen an HEK293-TREx-MaxiK- α + β ₁-Zellen

Für Benzimidazolone wie NS1619 wurden neben der direkten Aktivierung von MaxiK Kanälen auch eine unspezifische Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration beschrieben (Yamamura *et al.*, 2001).

Im folgenden wurde daher untersucht, inwieweit intrazelluläre Kalzium-Transienten auch am Aktivierungsmechanismus von CGS7181 beteiligt sind.

Die quantitative Erfassung der intrazellulären Kalzium-Konzentration erfolgte durch eine ratiometrische Fluoreszenzanalyse des Fluorophors Fura-2-AM (siehe 2.5). Für die Fluoreszenzuntersuchungen wurden HEK293-TREx-MaxiK- α + β ₁-Zellen verwendet. Nach Bindung von Ca²⁺ verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 380 nach 340nm, so dass sich aus dem Verhältnis der beiden Wellenlängen ein normalisiertes Maß für die Kalziumkonzentration bzw. -änderung bestimmen lässt.

In Abb. 15A-C sind Momentaufnahmen vor, während und 6s nach Zugabe des Aktivators in einer Farbkodierung dargestellt. Die Fluoreszenzwerte wurden als das Verhältnis der Emission bei Anregungswellenlängen von 340 und 380nm gemessen (F340/F380).

Abb. 15D beschreibt die Vorgänge im zeitlichen Verlauf: Bereits 50s nach CGS7181-Zugabe kam es zu einer Erhöhung der Fluoreszenz um 950%. Diese nahm dann mit einer Geschwindigkeit von 1% pro Sekunde nur langsam wieder ab. Die Zellen wirkten dabei stark geschädigt, was als Erklärung dafür dienen kann, warum die Ca²⁺-Konzentration nicht effektiver gesenkt wurde. Offensichtlich handelt es sich bei dieser Substanz um einen Ca²⁺-Ionophor.

Zusätzlich wurden Experimente in Gegenwart von 2mM EDTA durchgeführt, um extrazelluläres Kalzium zu entfernen. Nach der Zugabe von 10 μ M CGS-7181 wurde daraufhin eine Zunahme der Fluoreszenzänderung um 170% beobachtet (Daten hier nicht gezeigt).

Eine Zunahme des Fluoreszenzsignals wurde ebenfalls beobachtet, wenn 2 μ M der Substanz appliziert wurden. Bei einer Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 30°C wurde die Versuchsdurchführung von Abb.15 mit 2 μ M CGS7181 wiederholt; in diesem Fall betrug die Fluoreszenzänderung nur 92% (siehe Abb. 16).

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass CGS7181 die intrazelluläre Kalzium-Konzentration erhöht, indem es die Kationen sowohl aus der Badlösung als auch aus intrazellulären Speichern ins Zytosol überführt.

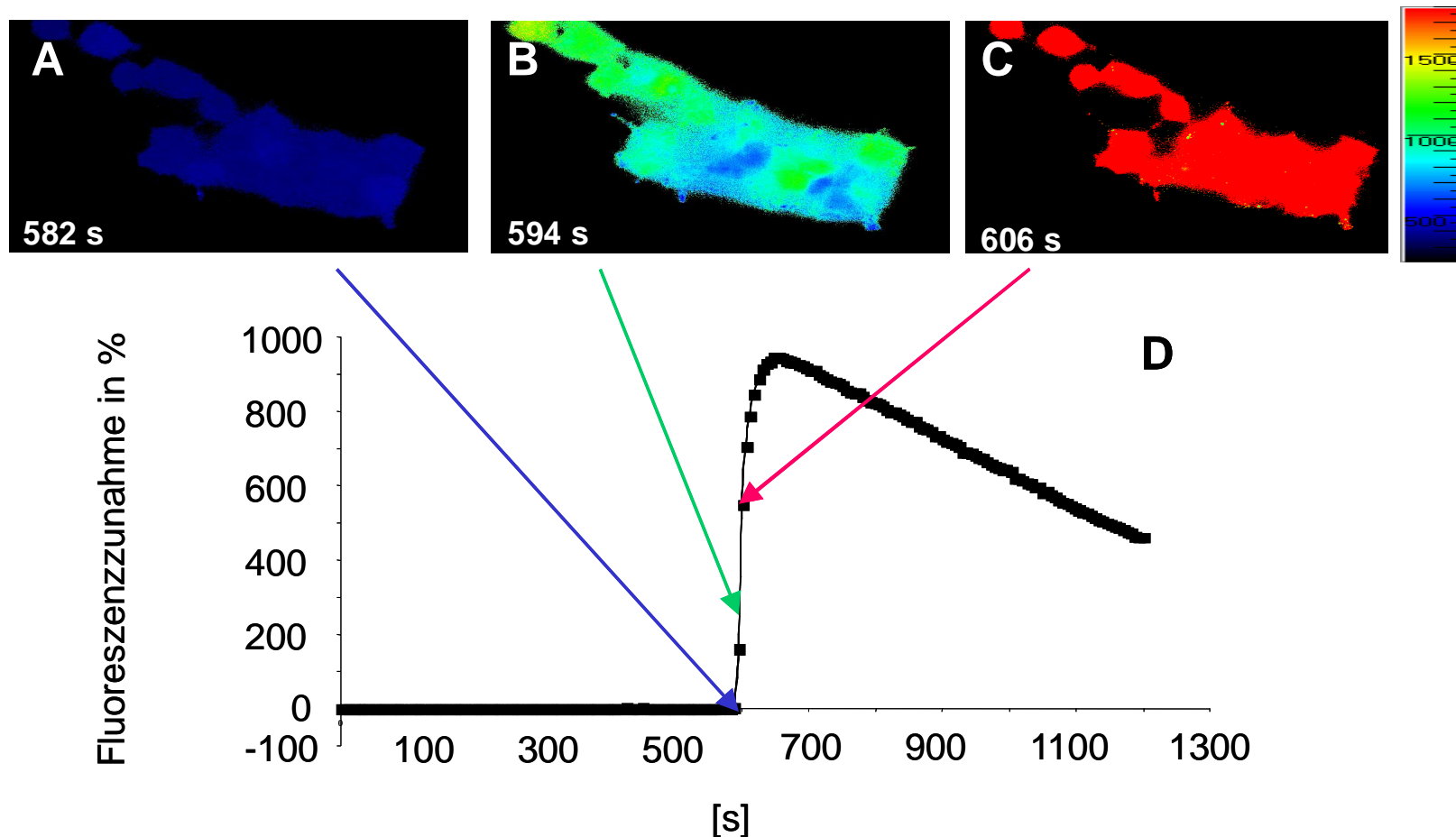


Abb. 15: Kalziumerhöhung durch 10 μ M CGS7181 in HEK293-Trex-MaxiK- α + β ₁-Zellen bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden mit 3 μ M Fura-2-AM eine Stunde vor der Messung beladen. Oben: Repräsentative Zellen vor (A), während (B) und 6 Sekunden nach der Zugabe von 10 μ M CGS7181 (C). Dargestellt sind die Fluoreszenzzunahmen als Änderung des Verhältnisses der Anregungswellenlängen 340 und 380nm. Die Farbskala stellt absolute Fluoreszenzwerte (F₃₄₀/F₃₈₀) dar. Blaue Areale kennzeichnen Bereiche niedriger Ca²⁺-Konzentration, während gelbe und besonders rote Areale hohe Konzentrationen anzeigen (siehe Farbskala rechts). Die Vergrößerung betrug 400fach. Unten: (D) Zeitlicher Verlauf der Änderung der Fluoreszenzintensitäten (F₃₄₀/F₃₈₀nm). Die Intensitäten vor Zugabe von CGS7181 wurden auf Null gesetzt. Nach 580s wurde CGS7181 so zugegeben, dass eine finale Konzentration von 10 μ M vorlag. Im Gegensatz zur Farbskala in A-C ist hier die prozentuale Änderung des F₃₄₀/F₃₈₀ Fluoreszenzverhältnisses aufgetragen.

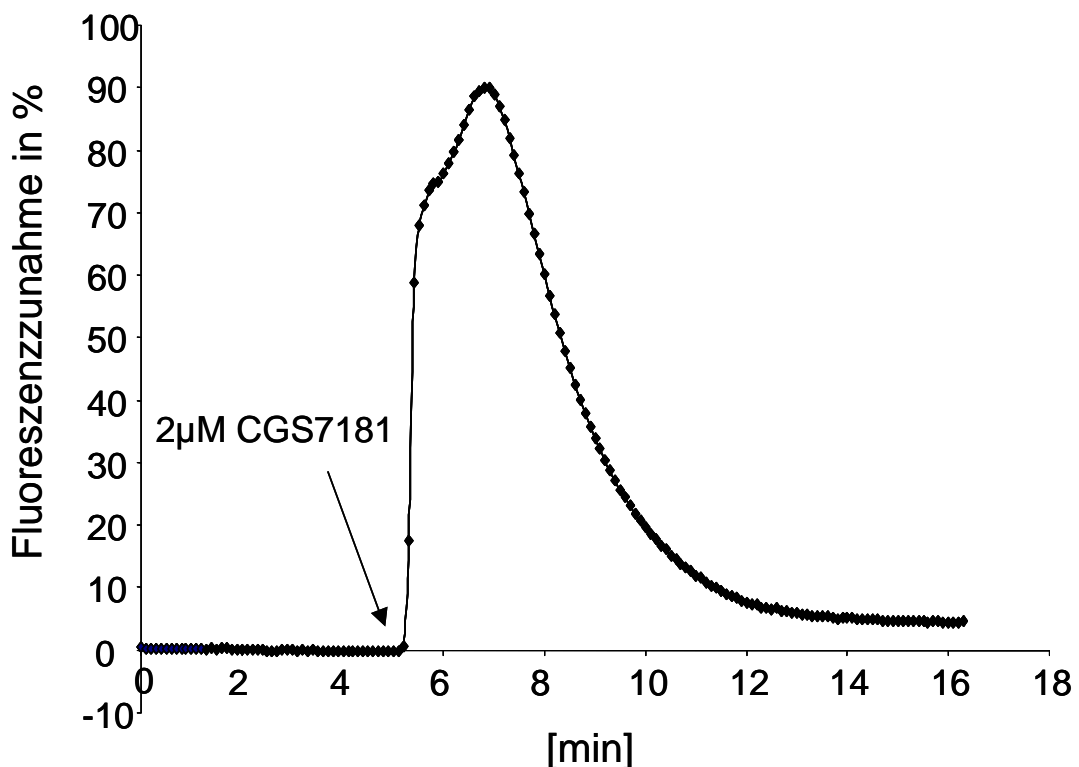


Abb. 16: Kalziumerhöhung durch 2µM CGS7181 in HEK293-Trex-MaxiK- α + β ₁-Zellen bei 30°C. Die Zellen wurden mit 3µM Fura-2-AM eine Stunde vor der Messung beladen. Die Änderungen der Fluoreszenzintensitäten sind über die Dauer der Messung dargestellt. Nachdem eine stabile Basislinie erreicht worden war, wurden 2µM CGS7181 nach 5,1min zugesetzt. Gezeigt ist die Kinetik der Verhältnis-Änderung 340/ 380nm der bei 510nm emittierten Fluoreszenzintensitäten.

Kalzium wird intrazellulär im wesentlichen im ER und in den Mitochondrien gespeichert. Um ein differenzierteres Bild der Lokalisation von Kalzium-Speichern zu erhalten, die durch CGS7181 depletiert werden, wurde der spezifische SERCA-Inhibitor Thapsigargin eingesetzt. Dieser Naturstoff hemmt die konstitutive Kalziumpumpe des endoplasmatischen Retikulums, so dass durch passive Diffusion oder durch spontane Aktivität der endogenen Kalziumkanäle entwichenes Ca^{2+} nicht mehr zurückgeführt werden kann. Thapsigargin führt damit indirekt zum Entleeren der ER-Speicher (Berridge *et al.*, 2000).

Daher wurde im folgenden Versuch zunächst 1µM Thapsigargin in Ca^{2+} -freier Badlösung 5min nach Beginn der Aufzeichnung appliziert und die Zellen für 30min in dieser Lösung belassen (siehe Abb.17). Dabei konnte eine schnelle Zunahme der Spektral-Verschiebung als Reaktion auf den erhöhten zytosolischen Kalziumspiegel registriert werden. Etwa 15min nach Zugabe des Inhibitors war der Kalziumspiegel wieder auf sein ursprüngliches Niveau zurückgekehrt, da das Kation aus dem Zytosol z.B. in den Extrazellularraum transportiert worden war. Um den verbliebenen Kalziumgehalt im ER zu überprüfen, wurden durch Zugabe von 100µM ATP, welches G-Protein-gekoppelte P2Y-Rezeptoren aktiviert, nach 30min die Entleerung der ER-Speicher über die Kalziumpumpen stimuliert. Das Ausbleiben eines

Ca²⁺-Transienten nach dieser Zugabe verweist auf die effektive Entleerung (und fehlende Befüllung) der ER-Speicher durch Thapsigargin. 55min nach Beginn der Aufzeichnung wurde 10µM CGS7181 in die Badlösung gegeben, wodurch die Spektral-Verschiebung um ca. 30% zunahm. Daraus konnte geschlossen werden, dass neben dem Kalzium-Speicher im ER auch andere Kompartimente wie z.B. Mitochondrien durch den MaxiK-Aktivator Ca²⁺-depletiert werden. Wiederum fällt auf, dass im Gegensatz zur vorherigen Thapsigargin-Wirkung die Zelle den Kalziumanstieg als Antwort auf die CGS7181-Zugabe nur unzureichend kompensieren kann.

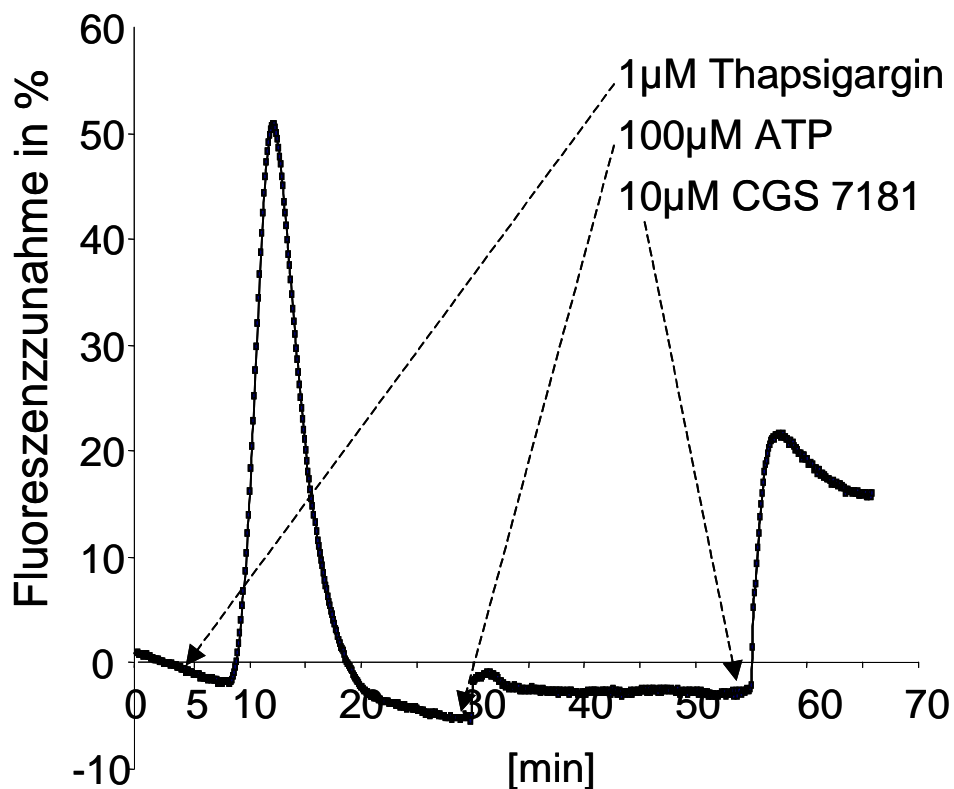


Abb. 17: Intrazelluläre Kalziumerhöhung durch 10µM CGS7181 in Anwesenheit von EDTA und Vorbehandlung mit Thapsigargin in HEK293-T-Rex-MaxiK-α+β₁-Zellen bei 30°C. Die Zellen wurden mit 3µM Fura-2-AM eine Stunde vor der Messung beladen. Die Änderungen der Fluoreszenzintensitäten sind über die Dauer der Messung dargestellt und die Pfeile markieren die jeweiligen Zugabezeitpunkte. 1µM Thapsigargin wurde nach 5min zugegeben. Nach Wiedererreichen einer stabilen Basislinie wurde mit 100µM ATP der verbliebene Ca-Inhalt der intrazellulären Speicher überprüft. Nach 55min wurden 10µM CGS 7181 zugesetzt.

Dafür bieten sich in erster Linie zwei plausible Erklärungen an: Zunächst deutet es auf den Ionophor-Charakter der Substanz hin, die in zelluläre Kompartimente rücktransportiertes Kalzium schnell wieder verfügbar macht.

Ein Teil des Kalziums wird jedoch auch in den Extrazellulärraum geschleust, wo es durch EDTA komplexiert und damit zum Transport nicht mehr zur Verfügung steht. Damit verbleibt andererseits auch die Möglichkeit, dass CGS7181 neben seiner Ca²⁺-transportierenden Ei-

genschaft weitere, toxische Effekte auf die Zelle ausübt, sodass die Regulationsmechanismen der Ca^{2+} -Homöostase versagen.

Zusammenfassend konnten dem MaxiK-Aktivator CGS7181 damit sowohl ein direkter Effekt auf die MaxiK-vermittelten Kaliumströme als auch Ca^{2+} -Ionophor-Eigenschaften nachgewiesen werden. Eine Empfehlung als Startpunkt für die Synthese verwandter Substanzen kann daher nicht ohne weiteres ausgesprochen werden.

3.1.6 Analyse der Kanalaktivierung durch Pimarinsäure in CHO-TREx-MaxiK- $\alpha+\beta_1$ -Zellen

Zu den Naturstoffen mit terpenoider Struktur, die als Maxi-Öffner bekannt sind (siehe Abb.18), gehört neben dem bereits erwähnten DHS auch das MaxiKdiol (Kaczorowski *et al.*, 1996). Wie die meisten Terpene sind diese Substanzen wegen ihrer sehr geringen Zellmembranpermeabilität nicht als therapeutische Substanz effektiv. Eine strukturelle Verwandtschaft mit Maxikdiol, dem Derivat einer Abietinsäure, besitzt die Pimarinsäure (aus dem Harz der Pinie).

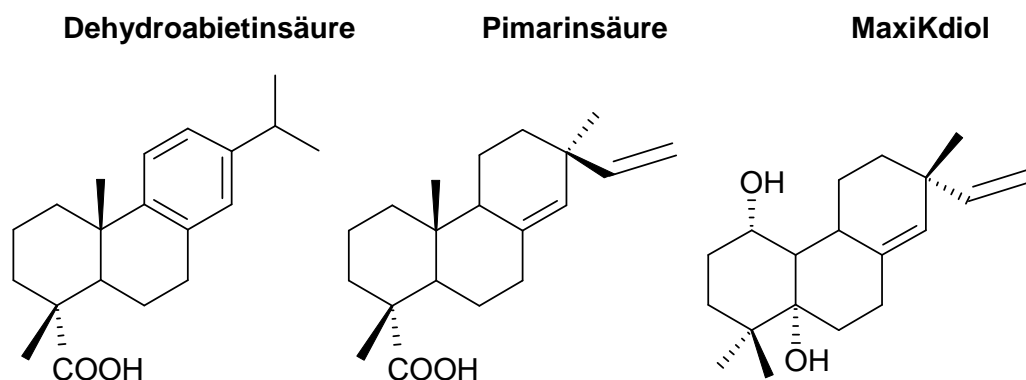


Abb.18: Struktur von Maxikdiol und verwandten terpenoiden MaxiK-Aktivatoren.

2002 beschrieben Imaizumi *et al.*, dass Pimarinsäure in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ MaxiK-vermittelte Kaliumströme signifikant aktiviert und damit dem Maxikdiol überlegen zu sein scheint, welches eine signifikante Aktivierung erst ab $3\mu\text{M}$ zeigt (Imaizumi *et al.*, 2002). Ein weiterer Vorteil bei Verwendung dieser Substanz besteht darin, dass Pimarinsäure sowohl nach intra- als auch extrazellulärer Gabe wirkt, während der Effekt des MaxiKdiols nur in der inside-out Konfiguration der Patch-Clamp Technik, also nach intrazellulärer Applikation nachgewiesen werden kann. Pimarinsäure gehört im weiteren Sinn zu den Abietinsäuren. Naturstoffe auf der Grundlage der Dehydroabietinsäuren stellen nach Ohwada (Ohwada *et al.*, 2003) eine neue Substanzklasse für MaxiK Kanalöffner dar. Demnach scheint das Abie-

tinsäure-Grundgerüst ein interessanter Ansatzpunkt für die Entwicklung von MaxiK-Aktivatoren darzustellen.

Um die Wirksamkeit dieser Substanzklasse im Testsystem unter Beweis zu stellen, wurden Patch-Clamp Messungen in der Ganzzell-Konfiguration unter Verwendung von 10 μ M Pimarinsäure an CHO-TREx- α + β ₁ Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb.19 dargestellt.

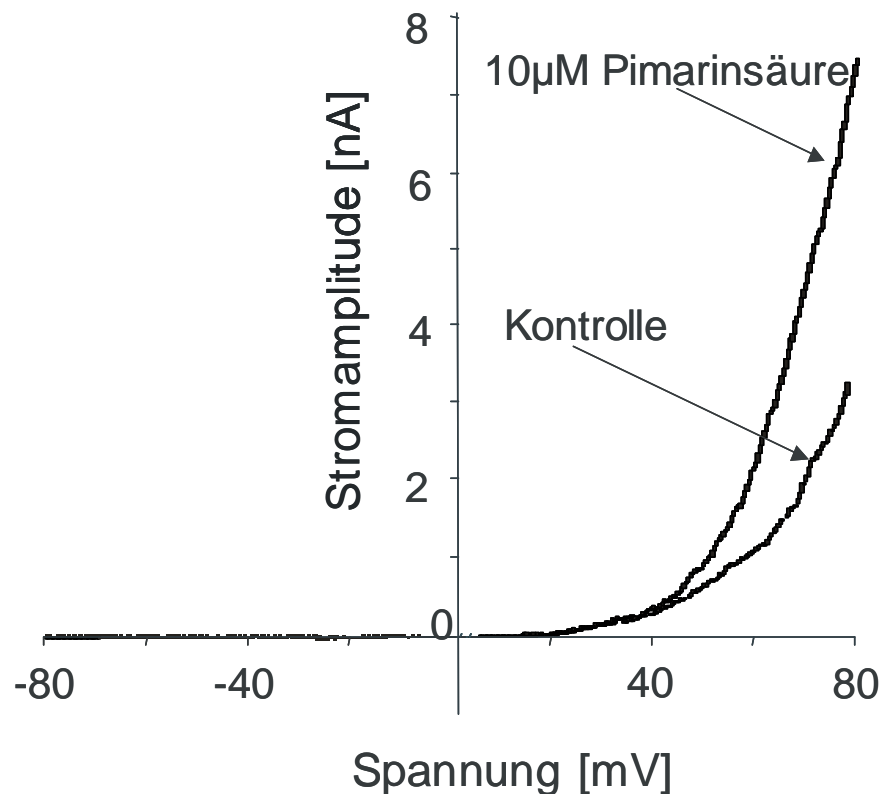


Abb. 19: Aktivierung von MaxiK-vermittelten Kaliumströmen durch 10 μ M Pimarinsäure in CHO-TREx-MaxiK- α + β ₁-Zellen in der Ganzzell-Ableitung. Dargestellt sind jeweils repräsentative Stromspuren vor (Kontrolle) und nach der Aktivierung im zeitlichen Verlauf der Spannungsrampe (Haltepotential bei -80mV, auf +80mV geändert).

Die Substanz führte bei +80mV zu einer durchschnittlichen Erhöhung um 245 \pm 37% der Stromamplitude gegenüber den Ausgangsbedingungen (n=9). Im Vergleich mit CGS7181 besitzt die Pimarinsäure damit eine schwächere Aktivität.

3.1.7 Indirekte Kanalaktivierung durch Stimulation der löslichen Guanylatzyklase

Die komplexe Regulation des MaxiK-Proteinkomplexes durch intrazelluläre Signalkaskaden wurde bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben. Die Modulation durch die Proteinkinase A, C und G sowie die Rho-Kinase im glatten Muskel lässt sich gegebenenfalls auch im heterologen Expressionssystem untersuchen, denn diese Proteinkinase werden nahezu in allen Säugetierzellen exprimiert. Ohne das spezifische zelluläre Kofaktoren bekannt waren, wurde daher in einem weiteren Ansatz untersucht, ob die etablierten Testsysteme auch

eine indirekte Kanal-Aktivierung über einen intrazellulären Signalwege anzeigen. Dies ist auch im Hinblick auf eine spätere Durchmusterung der Substanzbibliothek von Bedeutung, da in diesem Falle direkte und indirekte Kanalaktivierungen möglicherweise ununterscheidbar sind.

Durch die Stimulation der löslichen Guanylatzyklase wird der cGMP-Spiegel der Zelle erhöht und nachfolgend die Relaxation der glatten Muskelzelle gefördert. Der bekannteste Aktivator der Zyklase ist das gasförmige Stickstoffmonoxid NO, und daher werden Substanzen, die NO freisetzen, schon lange als Antianginosa in der Therapie der Angina Pectoris erfolgreich eingesetzt (Mutschler et al., 2003). Die Erhöhung des cGMP-Spiegels bildet das Signal zur Aktivierung der Proteinkinase G, die den MaxiK Kanal per Phosphorylierung aktiviert (siehe 1.4). So sollten der Theorie nach Substanzen, die die lösliche Guanylatzyklase stimulieren dieses letztlich auch beim MaxiK Kanal bewirken. Zwei solcher Substanzen, Ave1766 und Ave1069, die im Rahmen des Aventis-internen Projektes „Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase“ durch ein gutes Wirk- und Selektivitätsprofil auffielen, wurden daher im folgenden mittels Patch-Clamp-Technik auf eine MaxiK-Modulation hin untersucht. Da die intrazelluläre Signalmaschinerie möglichst unversehrt bleiben musste, wurde in diesem Fall die Ganzzell-Konfiguration eingesetzt.

Für diese Experimente wurden humane HEK293-TREx-MaxiK- α + β ₁-Zellen verwendet und jeweils 10 μ M Substanz eingesetzt. MaxiK-vermittelte Kaliumströme wurden ausgehend von einem Haltepotential bei -80 mV durch eine Spannungsrampe auf +80 mV ausgelöst und in der Ganzzell-Konfiguration gemessen, um eine Unversehrtheit des Signalapparates zu gewährleisten. Als Vergleich diente der entsprechende Wildtyp HEK293-TREx-wt. Das Ergebnis ist in Abb.20 dargestellt.

Beide Substanzen aktivieren den MaxiK Kanal, wobei Ave1766 mit einer Stromamplitudenerhöhung von 214 \pm 19% (n=22) gegenüber 154 \pm 10% (n=21) für Ave1069 die aktivere ist. Im Gegensatz dazu verursachen beide Substanzen keine Steigerung des Auswärtsstromes in den Wildtypzellen; tatsächlich liegen die gemessenen Werte mit 84 \pm 5% (Ave1766, n=8) bzw. 86 \pm 6% (Ave1069, n=8) unterhalb der Ausgangswerte, ohne dass dafür eine plausible Erklärung vorliegt.

Bei beiden Substanzen konnte ein annähernd vollständiger Auswascheffekt beobachtet werden (siehe Abb. 20B). Im Falle von Ave1069 war die Aktivierung fast vollständig reversibel (2 \pm 11%, n=7), bei der potenteren Ave1766 zeigte sich nach Applikation der Substanz und anschließender Auswaschphase eine gegenüber dem Ausgangswert um 17 \pm 13% (n=9) er-

höhte Stromamplitude. Demnach bleibt festzuhalten, dass es hierbei um eine reversible Stimulation handelt, wie man es für einen Signalweg-vermittelten Effekt erwarten kann.

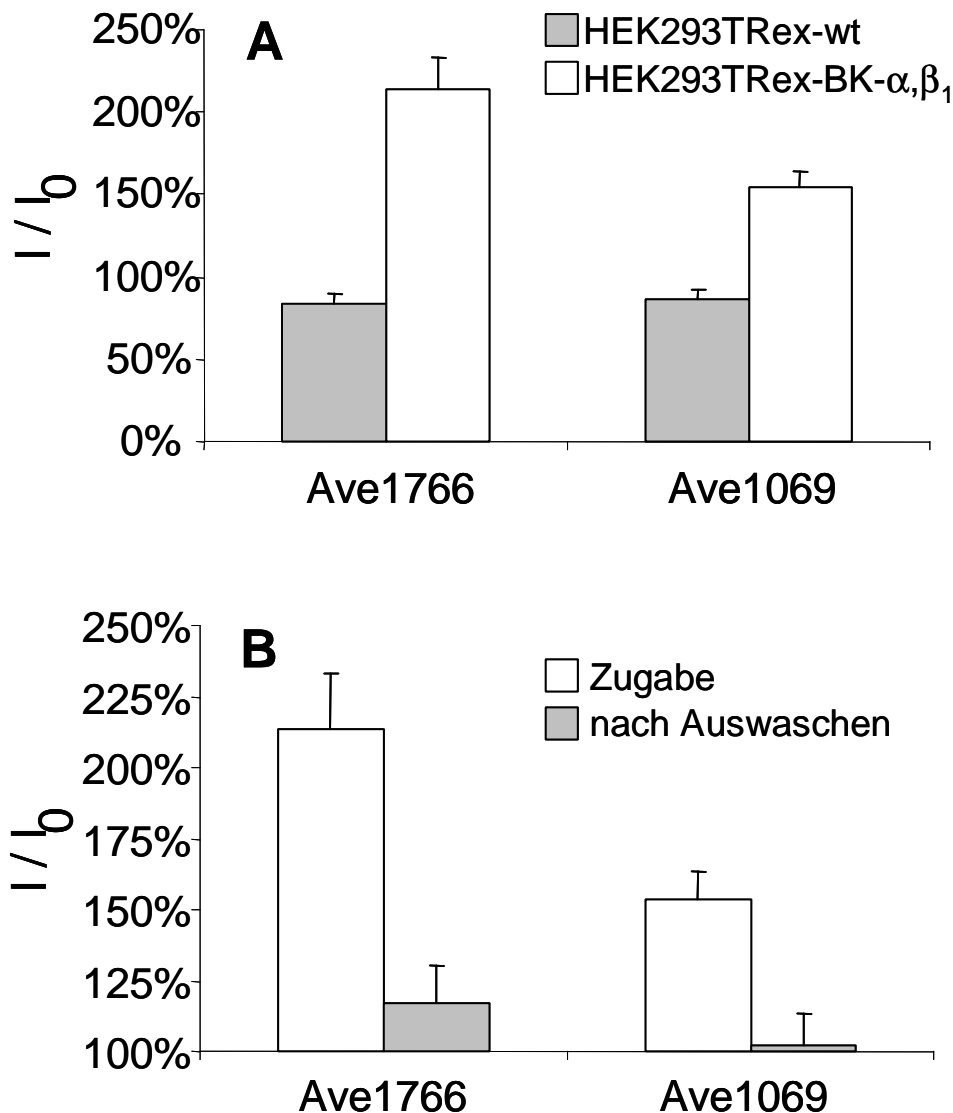


Abb. 20: MaxiK-vermittelte Kaliumströme nach Applikation von 10 μ M Ave1766 bzw. Ave1069 in HEK293-Trex-MaxiK- α + β 1-Zellen. Das Spannungsprotokoll bestand aus einer Spannungsrampe, die von -80 bis +80mV angelegt wurde; gemessen wurde in der Ganzzell-Konfiguration. Die Kalziumkonzentration im Bad betrug 100nM. Dargestellt sind resultierende Ströme nach Applikation der jeweiligen Substanz, normiert durch den Strom vor der Applikation. 100% entsprechen daher einer unveränderten Stromamplitude. **(A)** Vergleich der Wirkung beider Substanzen auf transfizierte und Wildtyp-Zellen. **(B)** Auswaschbarkeit des MaxiK-aktivierenden Effektes der beiden Substanzen. Die Auswaschphase bestand in einer 5 minütigen Perfusion mit Badlösung.

3.1.8 Analyse der Kanalaktivierung durch Inhibitoren der Rho-Kinase

Die Rho-Kinase-Signalkaskade stellt einen wichtigen, Ca²⁺-unabhängigen Weg zur Kontraktionsaktivierung dar (siehe 1.2) und verstärkt die Vasokonstriktion (Somlyo & Somlyo, 2003). Damit bildet es einen Gegenspieler zum MaxiK Kanal. Da bekannt ist, dass Rho-Kinasen in die Regulation von Ionenkanälen eingreifen, bestand die Möglichkeit, dass Inhibitoren der Rho-Kinase indirekt einen aktivierenden Einfluss auf den MaxiK Kanal ausüben. Durch das

Projektteam „Inhibitoren der Rho-Kinase“ wurden drei neuentwickelte Inhibitoren zur Verfügung gestellt. Als Kontrollsubstanzen dienten Fasudil (Calbiochem CAS Nr. 146986-50-7) und Y-27632 (Calbiochem CAS Nr. 103745-39-7) (Narumiya *et al.*, 1997;Fu *et al.*, 1998). Beides sind bekannte Rho Kinase-Inhibitoren (Hu & Lee, 2003), und Fasudil ist in Japan unter dem Namen Eril® zur Behandlung des akuten zerebralen Vasospasmus nach einem Hirninsult zugelassen.

Zur Untersuchung der Effekte wurden je 10µM der Substanzen in die Badlösung gegeben, während Ströme in der Ganzzell-Konfiguration in CHO-Trex-MaxiK-α+β₁-Zellen registriert wurden. Die Ströme wurden durch eine Spannungsrampe ausgelöst, die vom Haltepotential bei -80 auf +80mV depolarisierte. In Abb.21 sind die mittleren Stromamplituden (gemessen bei +80mV) nach Zugabe der Substanzen dargestellt, die jeweils mit den Amplituden vor der Applikation normiert wurden.

Zwei der fünf Substanzen verursachten eine signifikante Aktivierung der MaxiK-vermittelten Auswärtsströme in CHO-Trex-MaxiK-α+β₁-Zellen. Im Falle von Y-27632 erhöhte sich die Stromamplitude um 32±9% (n=11), im Falle von Cpd1 um 49±14% (n=5) . Im Gegensatz dazu führten weder Fasudil (11±9%, n=3), noch Cpd2 (17±12%, n=3) oder Cpd3 (-3±3%, n=5) zu einer signifikanten Erhöhung.

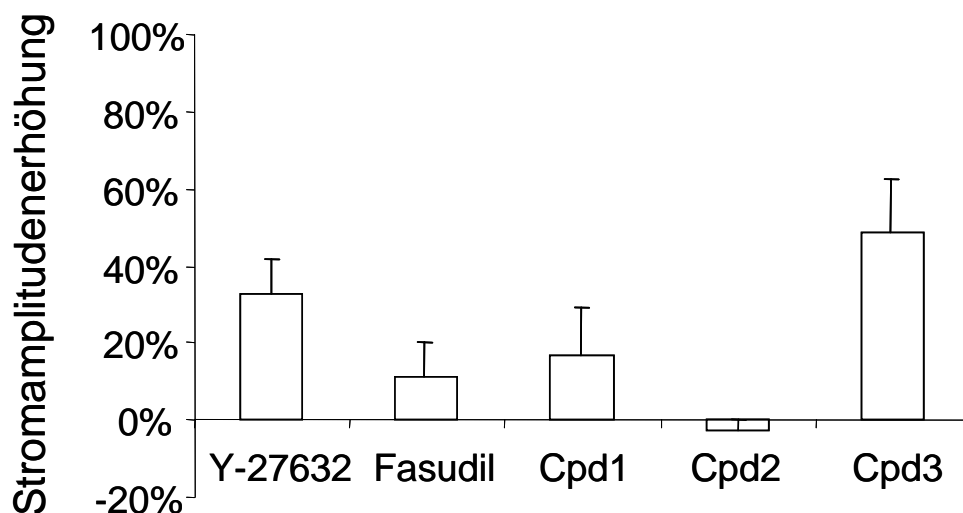


Abb. 21: Aktivierung MaxiK-vermittelter Auswärtsströme durch Rho-Kinase-Inhibitoren in CHO-Trex-MaxiK-α+β₁-Zellen. Dargestellt sind mittlere Stromamplituden (± SEM) 2-3min nach Zugabe von jeweils 10µM Substanz in der Ganzzell-Konfiguration, die auf die jeweiligen Ströme vor der Applikation normiert wurden. Die Ströme wurden durch Spannungsrampen von -80 auf +80mV ausgelöst und die Stromamplituden bei +80mV ausgewertet.

Ein Vergleich mit den Daten, die durch Messung der Acetylcholin-induzierten Vasorelaxation isolierter Rattenaorten („aortic rings“) für die verwendeten Substanzen erhalten wurden, erbrachte jedoch keine Korrelation der Messergebnisse (siehe Tab.4). Daher kann nicht von einer Kopplung zwischen Rho-Kinase-Signalweg und BK-Aktivierung im HEK293-System ausgegangen werden.

Rho-Kinase-Inhibitor	BK-Aktivierung [%]	„aortic rings“ [IC50, nM]
Y-27632	132±9	800
Fasudil	111±9	800
Cpd1	149±14	500
Cpd2	117±12	500
Cpd3	97±3	500

Tabelle 4: Vergleich der Daten für Rho-Kinase-Inhibitoren aus dem „aortic ring“-Modell und der MaxiK-Aktivierung im Zellsystem CHO-Trex-MaxiK- α + β 1. Zur MaxiK-Aktivierung (Ganzzellkonfiguration, siehe auch Abb.21) wurden jeweils 10 μ M Substanz eingesetzt. Die IC50-Werte der „aortic rings“-Messungen wurden freundlicherweise von Frau Apothekerin Kerstin Steioff zur Verfügung gestellt.

3.2 Die Spleißvariante MaxiK- α Δ S8

Bei der Reklonierung der humanen MaxiK- α -Untereinheit aus einer Herz-cDNS-Bibliothek durch M. Hechenberger (Aventis Pharma, Martinsried) wurde neben der publizierten cDNS auch eine um 69bp verkürzte Variante identifiziert, die eine deletierte S8-Domäne aufwies (siehe Abb.22). Diese Deletion war bislang noch nicht beschrieben worden und wurde daher als MaxiK- α Δ S8 bezeichnet. Da von beiden cDNS nur jeweils ein Fragment isoliert werden konnte, stellte sich allerdings die Frage, ob es sich hierbei eventuell um ein Klonierungsartefakt handeln könnte. Die Tatsache, MaxiK- α -Varianten in einer Herz-cDNS-Bank zu identifizieren, widersprach darüber hinaus den Literaturangaben (Orio *et al.*, 2002), nach denen der MaxiK Kanal im Herzen nicht exprimiert wird.

Daher wurde zunächst der Versuch unternommen, die Existenz der neu isolierten MaxiK α -Variante molekularbiologisch zu verifizieren und im weiteren die Gewebe-Expression sowohl des undeletierten Wildtyp- als auch der Δ S8-cDNS zu ermitteln.

3.2.1 Untersuchung der Gewebe-Expression der MaxiK- $\alpha\Delta S8$ -Variante

Zum Nachweis von MaxiK- α -Transkripten wurden verschiedene Oligonukleotidprimer entworfen. Die Amplifikationsstrategie ist in Abb.22 schematisch dargestellt:

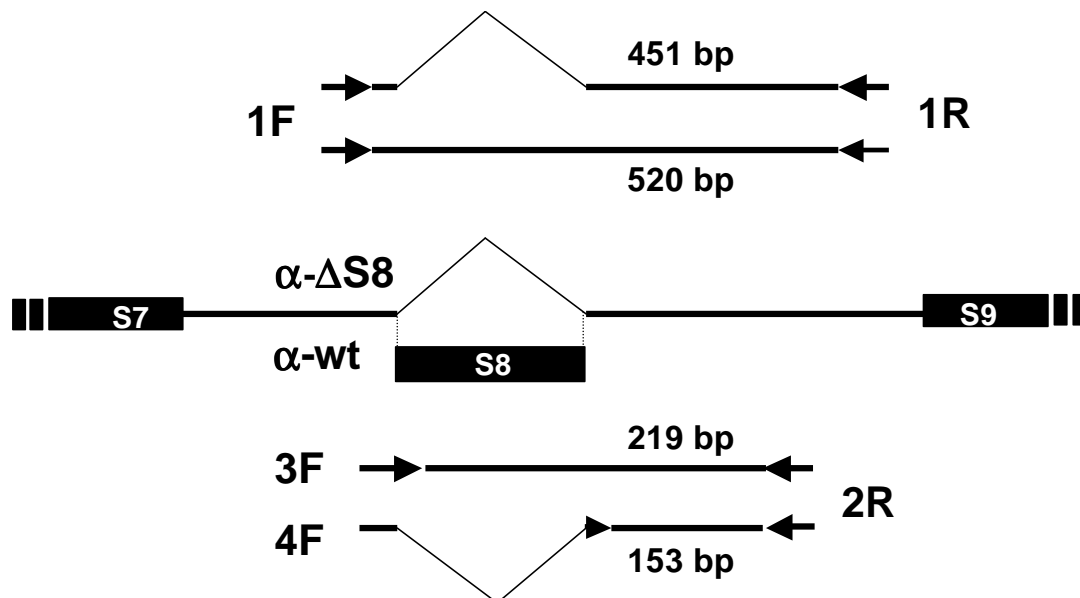


Abb. 22: Schematische Darstellung der neu identifizierten $\alpha\Delta S8$ -Variante und Lokalisation der Oligonukleotidprimer, die zur Expressionsanalyse eingesetzt wurden. Erläuterungen, siehe Text.

Unter Verwendung des Primerpaares 1F / 1R, welche flankierend zur Deletionsregion hybridisieren, lassen sich sowohl Wildtyp- als auch $\alpha\Delta S8$ -spezifische Transkripte mit einer jeweiligen Basenpaarlänge von 520 bzw. 451bp generieren. Da beide Amplifikationen miteinander um die Reaktionsedukte konkurrieren, ist zu erwarten, dass bei Koexpression der beiden Varianten grundsätzlich das kürzere Amplifikationsprodukt vermehrt gebildet wird, da es weniger Nukleotide und Polymerasen-Aktivität benötigt. Das erwartete Bandenmuster entspräche daher nicht den tatsächlichen Mengenverhältnissen in der cDNS-Bank.

Daher wurden zusätzlich die Varianten-spezifischen Oligonukleotide 3F und 4F als Komplementärsequenz des Deletionsbereiches synthetisiert. 18 ihrer 21 Nukleotide sind identisch und entsprechen dem Abschnitt unmittelbar vor der Deletion. 3F besitzt am 3'-Ende die Basenabfolge GCT, die im Wildtyp folgt, während im Falle von 4F das Triplet TAT mit dem Nukleotidbereich nach der Deletion hybridisiert. 4F kann daher nur im Falle der $\Delta S8$ -Variante hybridisieren (eine 3-Basen-Fehlpaarung am 3'-Ende unterdrückt die Amplifikation effizient, da die Polymerase an dieser Stelle angreift). Da das Triplet GCT gegenüber TAT eine thermodynamisch stabilere Assoziation mit der cDNS-Matrize eingeht, wäre die Amplifikation von Wildtyp-Transkripten möglicherweise in diesem Fall begünstigt, umgekehrt zur ersten Strategie. Ein Vergleich der Produkte aus beiden Strategien könnte daher einen brauchbaren Ansatz zur halbwegs quantitativen Bestimmung des Verhältnisses der beiden Varianten liefern.

Als Ausgangspunkt für den Nachweis von MaxiK α -wt und - Δ S8-Variante mittel RT-PCR (siehe 2.1.6) wurde eine kommerziell erhältliche humane cDNS-Bank (Human MTC Panel, QUICK-Clone™ cDNS, Clontech BD, Heidelberg) eingesetzt. Diese cDNS-Sammlung enthält mRNS-Sequenzen aus verschiedenen Organen wie Herz, Gehirn, Leber, Lunge, Niere, Pankreas, Plazenta und Skelettmuskel, die getrennt voneinander aufgereinigt und mittels reverser Transkription in DNS umgeschrieben werden. Zusätzlich wurde auch eine cDNS-Bank verwendet, die aus den Glattmuskelzellen humaner Harnblasen gewonnen wird (Human smooth muscle QUICK-Clone™ cDNS, Clontech BD, Heidelberg).

Durch den Einsatz von G3PDH-Oligonukleotiden, welche ein 983bp Produkt der cDNS des Enzyms Glukose3-phosphat-dehydrogenase amplifizieren, wurden die PCR-Reaktionen normiert. Dieses Enzym der Glykolyse wird in allen Zellen des Körpers gleichermaßen konstitutiv exprimiert; die Amplifikation dieses „Housekeeping-Gens“ (siehe 2.1.6) diente daher als interne Kontrolle für die mRNS- (bzw. cDNS-Qualität) sowie die Durchführung der PCR.

Abb.23A zeigt die gemeinsame Amplifikation durch das Primerpaar 1F/1R (Protokoll und verwendete Zyklenparameter, siehe 2.1.6.1). Die Kontroll-Amplifikationen von gleichen Mengen wt und $\alpha\Delta$ S8 in pcDNA3.1 ergaben cDNS-Fragmente mit den erwarteten Produktgrößen von 451 ($\alpha\Delta$ S8) bzw. 520bp (wt), die auch in den Gewebeproben identifiziert werden konnten. Die in B dargestellten G3PDH-Amplifikationen verdeutlichen, dass äquivalente mRNS-Mengen in diesen Versuchen eingesetzt wurden und so ein semi-quantitativer Vergleich der gewebespezifisch amplifizierten cDNS-Fragmente zulässig ist.

Aus den amplifizierten Hirn-, Plazenta- und Herzansätzen wurden PCR-Produkte mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität extrahiert und subkloniert. 7 dieser so erhaltenen Fragmente wurden sequenziert; dabei wurden 3 $\alpha\Delta$ S8- und 4 wt-cDNS identifiziert, jedoch keine weiteren Varianten und auch keine unspezifischen Produkte. Die schwachen Banden mit geringerer elektrophoretischer Beweglichkeit als das wt-PCR-Produkt beruhten daher möglicherweise auf der Bildung von Heteroduplexen verschiedener Stöchiometrie, wie es für diese Region mit vergleichbaren Oligonukleotidpaaren bereits gezeigt worden ist (Mahmoud *et al.*, 2002). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass darüber hinaus noch weitere, bislang nicht identifizierte MaxiK-Spleißvarianten existieren.

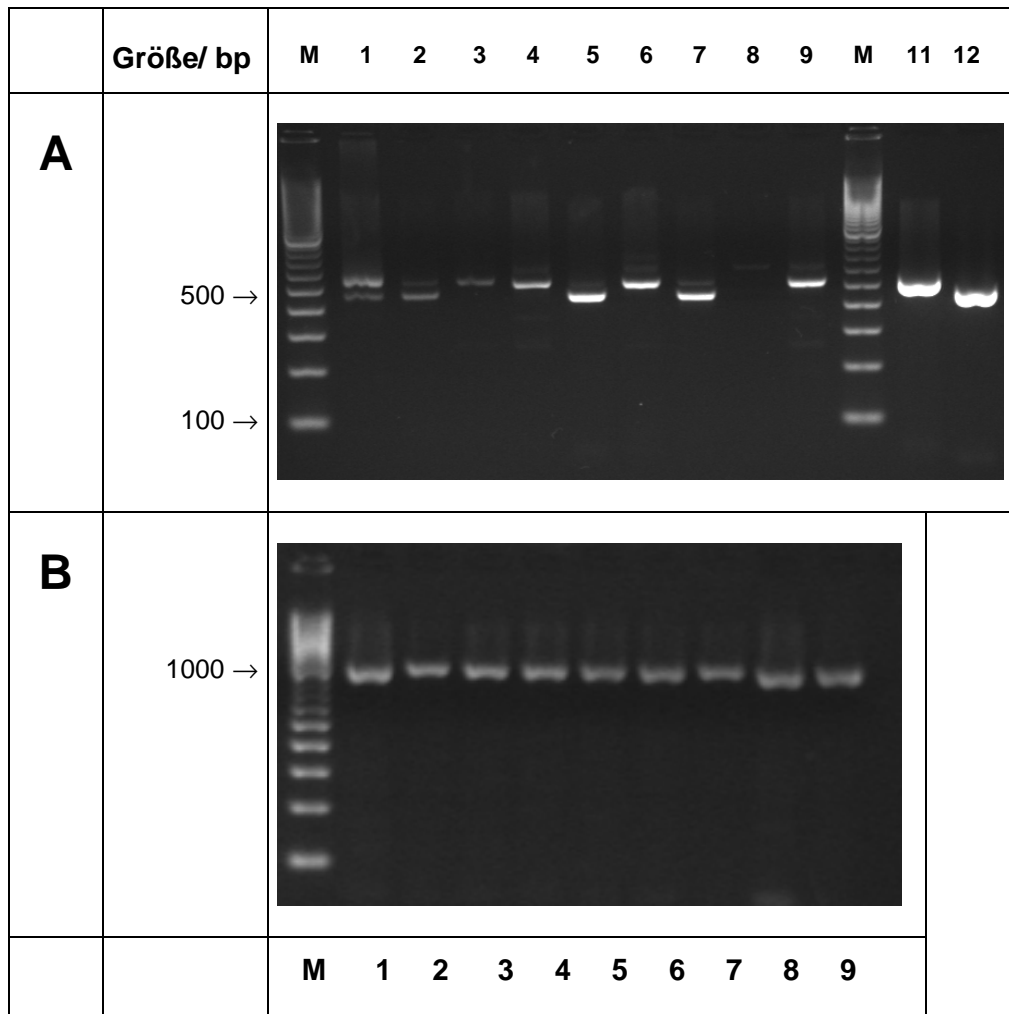


Abb. 23: Amplifikation von MaxiK-Spleissvarianten aus einer humanen cDNS-Sammlung (MTC I panel™, Clontech BD, Heidelberg) unter Verwendung des unspezifischen Primerpaares 1F/1R. Die elektrophoretisch aufgetrennten cDNS-Fragmente wurden jeweils in der Reihenfolge Gehirn (Spur 1), Herz (2), Lunge (3), Leber (4), Niere (5), Pankreas (6), Plazenta (7), Skelett- (8) und Glattmuskel (9) aufgetragen. Als Marker (M) wurde 100 bp-ladder™ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. **(A)** Dargestellt sind die cDNS-Fragmente, die aus einem repräsentativen PCR-Experiment durch Amplifikation mit dem unspezifischen Primerpaar 1F/1R (amplifiziert MaxiK-wt und MaxiK- $\alpha\Delta S8$, Produktgröße 451bp und 520bp) erhalten wurden. Die fehlende Bande im Falle des Skelettmuskels ist ein Versuchsartefakt. In Spur 11 und 12 sind die PCR-Produkte der Kontrollamplifikationen auf pcDNA3.1-MaxiK-wt bzw. pcDNA3.1-MaxiK- $\alpha\Delta S8$ aufgetragen. **(B)** Normierungsamplifikation der Gewebe-cDNS mit dem G3PDH-Primerpaar. Die Amplifikationsprodukte (Produktgröße 983bp) sind in der oben erwähnten Reihenfolge aufgetragen.

Während der Wildtyp wie erwartet in fast allen untersuchten Geweben (Ausnahme: Skelettmuskel, aber siehe hierzu Abb.24) in unterschiedlicher Stärke vorkommt, konnten auch MaxiK- $\alpha\Delta S8$ -Fragmente in einigen Organen detektiert werden.

In Leber, Lunge, Pankreas und glattem Muskel konnte ausschließlich MaxiK-wt detektiert werden, im Gehirn dominierten die Amplifikate über die entsprechenden MaxiK- $\alpha\Delta S8$ -Produkte. Wie erwartet ist die Expression in der Glattmuskelzellprobe besonders ausgeprägt. Überraschenderweise findet sich aber auch eine weitreichende Verbreitung der $\alpha\Delta S8$ -Variante. Sie scheint also nicht nur im Herzen, wo sie erstmalig entdeckt wurde, vorzukom-

men. Es gibt Gewebe, in denen die amplifizierten Transkripte mengenmäßig die Wildtyp-Transkripte überwiegen. So in Niere und Plazenta, aber auch im Herzen, wo das Expressionslevel beider Varianten relativ gering ist. Im Gehirn, der Region, in der die meisten Spleiß-Varianten des Proteins existieren, tritt sie ebenfalls auf, wenn auch in geringerer Menge als der Wildtyp. Dagegen konnten keine $\alpha\Delta S8$ -cDNS-Fragmente in Lunge, Leber, Pankreas, Skelett- und glattem Muskel detektiert werden.

Um die Ergebnisse dieser PCR zu verifizieren und der oben beschriebenen bevorzugten Amplifikation der kürzeren Variante entgegenzuwirken, wurden nun die Primerpaare 3F/2R bzw. 4F/2R verwendet (siehe Abb.24). Während das erste Paar Amplifikationsprodukte des MaxiK-wt von 219bp lieferte, führte das zweite zur Vermehrung eines MaxiK- $\alpha\Delta S8$ -Fragmentes mit einer Größe von 153 bp. Beide Produkte wurden in Kontrollamplifikationen auf vektorierter cDNS (Spur 10-13) bestätigt. Um Kreuzamplifikationen auszuschließen, wurden die Primerpaare auch wechselseitig mit den falschen Varianten als Matrizen eingesetzt. Wie die Spuren 11 und 12 in Abbildung 24 belegen, konnten in diesen Fällen keine Produkte erhalten werden. Daher war die Spezifität der verwendeten Oligonukleotidprimer gewährleistet.

Die dargestellte PCR konnte im wesentlichen das Expressionsprofil des unspezifischen Primerpaares 1F / 1R bestätigen. Während der Wildtyp ubiquitär exprimiert wird, konnten $\alpha\Delta S8$ -Transkripte in Hirn, Niere und Plazenta sowie in geringerem Ausmaß in Herz, Pankreas sowie Skelett- und Glattmuskel amplifiziert werden. Damit konnten im Gegensatz zum unspezifischen Primerpaar 1F/1R mit Hilfe von 4F/2R die $\alpha\Delta S8$ -Variante in letzteren Geweben identifiziert werden.

Die Intensitätsverhältnisse dieser Banden im Vergleich der Gewebeproben entspricht qualitativ der in Abb.23 beschriebenen Relationen. Es fällt auf, dass im Vergleich der jeweiligen Amplifikationsprodukte die Deletionsvariante in keinem Gewebe stärker exprimiert wird als der Wildtyp. Dies steht im Gegensatz zu Abb.23 und könnte, wie bereits erläutert, durch die bevorzugte Amplifikation des kürzeren PCR-Produktes bei Verwendung des unspezifischen Primerpaares begründet sein. Dennoch kann mit einiger Gewissheit angenommen werden, dass zumindest in Niere und Plazenta beide Transkripte in ähnlichen Mengen exprimiert werden.

Auch in dieser PCR konnten beide cDNS-Varianten im Herzgewebe nachgewiesen werden. Dennoch muss dies nicht zwangsläufig auf eine Expression des MaxiK- α -Proteins in Kardiomyozyten hindeuten; stattdessen sollte berücksichtigt werden, dass bei der Herz-Aufbereitung auch koronare Blutgefäße verarbeitet worden sind.

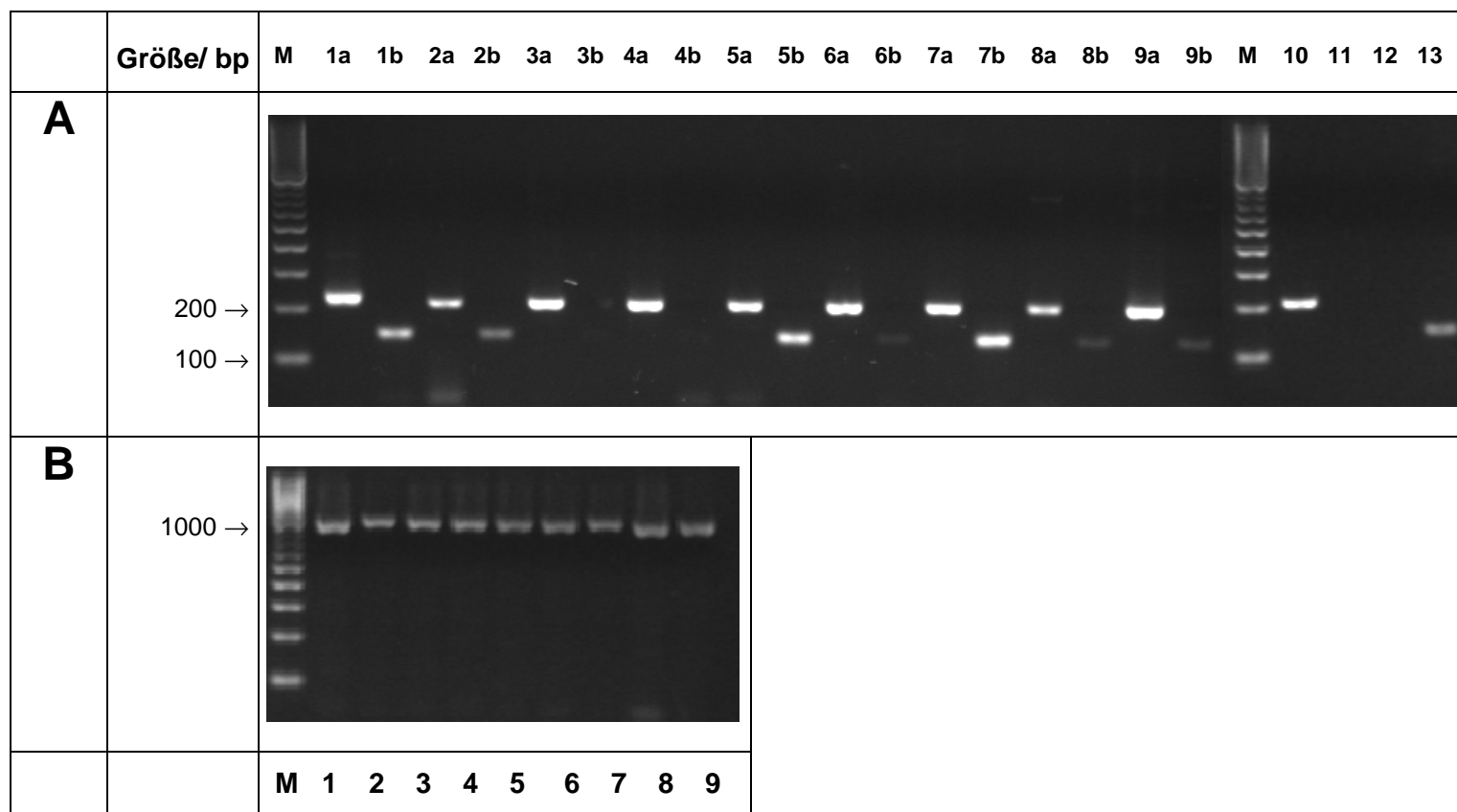


Abb. 24: Amplifikation von MaxiK-Spleissvarianten aus einer humanen cDNS-Sammlung (MTC I panel™, Clontech BD, Heidelberg) unter Verwendung der spezifischen Primerpaare 3F/2R bzw. 4F/2R. Die elektrophoretisch aufgetrennten cDNS-Fragmente wurden jeweils in der Reihenfolge Hirn (1), Herz (2), Lunge (3), Leber (4), Niere (5), Pankreas (6), Plazenta (7), Skelett- (8) und Glattmuskel (9) aufgetragen. Als Marker (M) wurde 100 bp-ladder™ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. **(A)** Dargestellt sind cDNS-Fragmente, die aus einem repräsentativen PCR-Experiment durch Amplifikation mit den Primerpaaren 3F/2R (amplifiziert MaxiK-wt, Produktgröße 219bp) und 4F/2R (MaxiK- $\alpha\Delta$ S8, Produktgröße 153bp) erhalten wurden. Für jede untersuchte Gewebe-cDNA wurden zuerst die Amplifikationsprodukte von 3F/2R und dann die von 4F/2R aufgetragen (Spur 1a-9b). Daher sind in Spur 10 und 11 bzw. 12 und 13 die PCR-Produkte der Kontroll-Amplifikationen auf pcDNA3.1-MaxiK-wt bzw. pcDNA3.1-MaxiK- $\alpha\Delta$ S8 aufgetrennt. Die schwache Bandenintensität in Spur 13 ist nicht repräsentativ. **(B)** Amplifikation zur semi-quantitativen Normierung der Gewebe cDNS mit dem G3PDH-Primerpaar. Die Amplifikationsprodukte (Produktgröße 983bp) sind in der oben erwähnten Reihenfolge aufgetragen; das Bild ist identisch mit Abb.16B.

Da der MaxiK Kanal im vaskulären System exprimiert wird, könnte dies die Herkunft der Amplifikationsprodukte erklären. Weiterhin könnte dies auch einen ersten Hinweis auf die Lokalisation der $\alpha\Delta S8$ -Spleißvariante liefern.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass es sich bei der MaxiK- $\alpha\Delta S8$ -Untereinheit nicht um ein Klonierungsartefakt handelt, da sie zweifelsfrei in humanen Gewebeproben in Form von cDNS-Fragmenten mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion identifiziert werden konnte.

3.2.2 Expressionsanalyse in *Xenopus laevis* Oozyten mittels TEVC

Zur funktionellen Analyse wurde MaxiK- $\alpha\Delta S8$ zunächst heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert. Im Gegensatz zu Kontrollversuchen, in denen der Wildtyp verwendet worden war, konnte keine signifikante Stromamplitudenerhöhung gegenüber der Negativkontrolle (Injektion von Wasser) detektiert werden (siehe Abb.25). Auch die Verdreifachung der Menge an $\alpha\Delta S8$ -RNS erbrachte keine Veränderung. In Folgeexperimenten wurden die Spleißvariante jeweils mit einer der vier in der Literatur beschriebenen β -Untereinheiten in *Xenopus* Oozyten koexprimiert. Keines der Hilfsproteine führte zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude gegenüber H_2O -injizierten Oozyten (Daten hier nicht gezeigt).

3.2.3 Untersuchungen zur Expression des MaxiK- $\alpha\Delta S8$ -Proteins in HEK293-Zellen

Die im vorangehenden Abschnitt beschriebenen elektrophysiologischen Messungen zeigten eine im Vergleich zum Wildtyp stark verringerte funktionelle Aktivität der MaxiK- $\alpha\Delta S8$ -Variante in *Xenopus laevis* Oozyten. Ursachen für den Verlust dieser Aktivität könnten sowohl strukturell bedingte Änderungen der Ionenleitfähigkeit des Kanalproteins als auch Probleme beim Transport oder der Assemblierung der Kanalkomplexe in der Zellmembran sein. Im folgenden wurde daher die Auswirkungen der S8-Deletion auf die Expression näher untersucht.

Die Expression eines rekombinanten Proteins in einem heterologen System ist immer an die Bedingung geknüpft, dass die endogenen zellulären Kofaktoren eine solche unterstützen. Während der Synthese und Transportvorgänge im ER und Golgi-Apparat assemblieren die Kanaluntereinheiten sowie weitere Hilfs- und Transportproteine des Expressionssystems. Voraussetzung für das Funktionieren dieser Prozesse ist selbstverständlich das Vorhandensein der entsprechenden akzessorischen Proteine im Expressionsmodell. Um die funktionelle Expression der $\alpha\Delta S8$ -Variante in einer ihrer natürlichen Umgebung besser als die

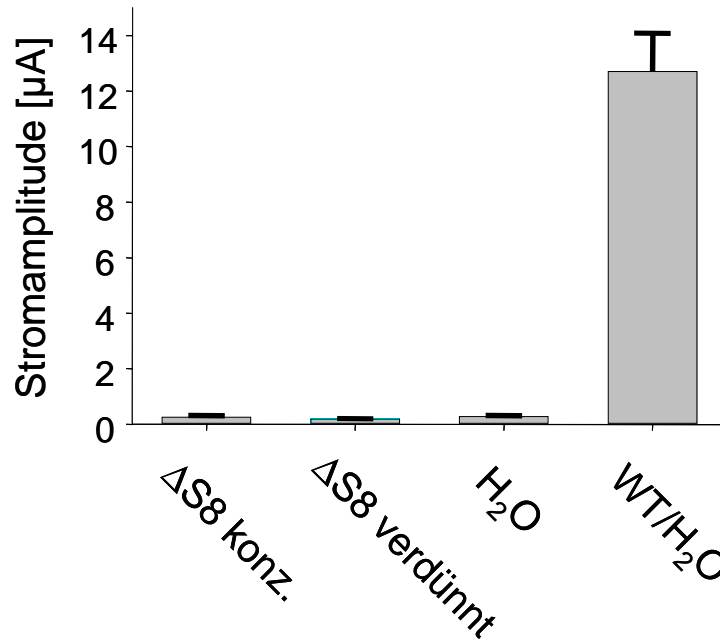


Abb. 25: Vergleich der Stromamplituden heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierter RNS des MaxiK- α Δ S8- bzw. -Wildtyp-Proteins. Ausgehend von einem Haltepotential von -80mV wurde ein Pulsprotokoll mit Spannungssprüngen, die jeweils um 20mV erhöht wurden, durchgeführt. Stellvertretend abgebildet ist die mittlere Stromamplitude für den Spannungssprung auf $+120\text{mV}$.

Jeweils 15ng RNS wurden für den Wildtyp (WT/H₂O, $n=56$) und die Spleißvariante (Δ S8 verdünnt, $n=47$) zur Injektion eingesetzt, darüber hinaus auch 50ng RNS im selben Volumen im Falle der α Δ S8-Variante (α Δ S8_{konz.}, $n=38$). Die Zahl der Experimente mit α Δ S8-exprimierenden Oozyten ist geringer, da mehr tote Oozyten als bei mit Wildtyp-exprimierenden Zellen erhalten wurden. Als Referenz dienten mit Wasser injizierte Oozyten ($n=40$).

Xenopus laevis Oozyte entsprechenden Modell zu studieren, wurde die Spleißvariante in humanen HEK293-Zellen exprimiert und elektrophysiologisch untersucht. Da Hilfsuntereinheiten häufig zur Expressionserhöhung führen (z.B. indem sie Retentionssignale maskieren), wurde ebenfalls der Effekt der β_1 -Untereinheit auf die Expression der MaxiK- α Δ S8 getestet.

3.2.3.1 Elektrophysiologische Untersuchungen

HEK293-Zellen wurden in einer Dichte von etwa 250.000 Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern ausgesät und mit $1,5\mu\text{g}$ MaxiK-Wildtyp bzw. MaxiK- α Δ S8 und $1,5\mu\text{g}$ MaxiK- β_1 transfiziert. GFP diente als Transfektionskontrolle und wurde in einer Menge von $0,3\mu\text{g}$ zugesetzt. Zusätzlich wurden Zellen mit einem Leervektor ($1,5\mu\text{g}$ pcDNA3.1) und GFP transfiziert. Ausgehend von einem Haltepotential von -80mV wurden in der Ganzzell-Konfiguration Spannungssprünge um 20mV bis $+140\text{mV}$ durchgeführt. Stellvertretend wurden in der Abbildung 26 die Stromamplituden sämtlicher Messungen bei den Potentialen von -60 und $+60\text{mV}$ gemittelt.

Wie Abb.26A zeigt, lieferte die MaxiK-Wildtyp-Expression charakteristische Ströme mit großen Stromamplituden; dagegen wiesen $\alpha\Delta S8$ -exprimierende HEK293-Zellen nur geringe Ströme auf, die sich dennoch signifikant von den mit Leervektor transfizierten Zellen unterschieden ($p=0,0135$, ANOVA). Im Folgeexperiment (Abb.26B) wurde der Einfluss der β_1 -Untereinheit näher untersucht, indem die Koexpression mit der $\alpha\Delta S8$ -Variante im Vergleich zu einer Koexpression mit dem lacZ-Protein gesetzt wurde. Letzteres diente nur der äquivalenten Auslastung der zellulären Transkriptions- bzw. Translationsmaschinerie.

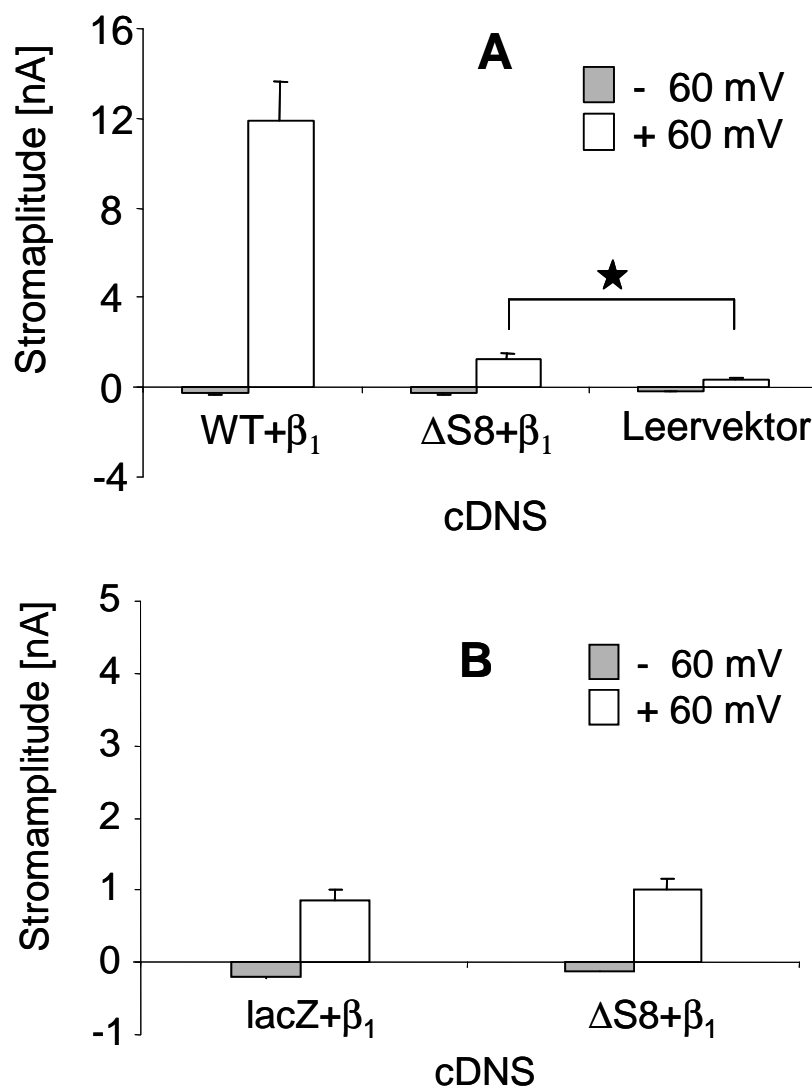


Abb. 26: Vergleich der MaxiK-wt und $-\alpha\Delta S8$ -Ströme in transient transfizierten HEK293-Zellen. Dargestellt sind Einzel- und Ko-transfektionen von HEK293-Zellen. In der Ganzzell-Konfiguration wurde ausgehend von -80mV das Potential stufenweise um 20mV erhöht; in dieser Abbildung sind nur die Stromamplituden bei -60 bzw. $+60\text{mV}$ angegeben. **(A)** Vergleich der jeweiligen Stromamplituden für den Wildtyp (wt, $n=11$), die Spleißvariante ($\alpha\Delta S8$, $n=20$) bei gleichzeitiger β_1 -Expression gegenüber Zellen, die nur mit pcDNA3.1 (Leervektor, $n=13$) transfiziert wurden. Die jeweiligen gemittelten Stromamplituden von $\alpha\Delta S8+\beta_1$ und „Leervektor“ sind signifikant verschieden. **(B)** Vergleich der Kotransfektion von MaxiK- $\alpha\Delta S8$ und β_1 ($\Delta S8 +\beta_1$, $n=20$) mit der entsprechenden Kontrolltransfektion $\beta_1+\text{lacZ}$ (lacZ+ β_1 , $n=16$). Die gemittelten Stromamplituden sind nicht signifikant verschieden.

Nach Kotransfektion von β_1 -Untereinheit und lacZ wurden Ströme in der gleichen Grössenordnung ($p = 0,29$, ANOVA) wie in $\alpha\Delta S8 + \beta_1$ exprimierenden Zellen registriert (Abb. 26B). Da lacZ, ähnlich wie das immer als Transfektionskontrolle mitgeführte GFP keinen Effekt auf K^+ -Ströme in HEK Zellen ausübt (Daten nicht gezeigt), stimuliert offensichtlich β_1 endogene Kaliumkanäle, entweder indem es ihre funktionellen Eigenschaften ändert, oder indem es den Transport zur Plasmamembran erhöht.

Um die Effekte von $\alpha\Delta S8$ - und β_1 -Proteinen genauer zu separieren, wurden Ströme in der inside-out-Konfiguration gemessen. Die Transfektion erfolgte dabei wie zuvor, indem $1,5\mu\text{g}$ Plasmid-DNS der jeweiligen Kotransfektanten und $3\mu\text{g}$ im Falle der Transfektion von $\alpha\Delta S8$ bzw. lacZ alleine eingesetzt wurden (siehe Abb.27).

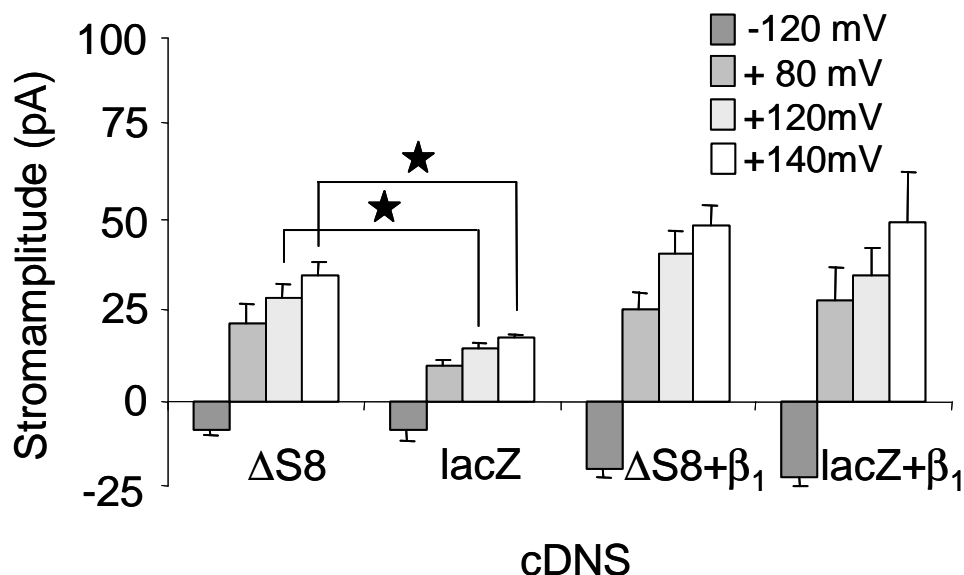


Abb. 27: Vergleich der Stromamplituden transient mit MaxiK- $\alpha\Delta S8$ - bzw. lacZ-cDNS transfizierten HEK293 Zellen mit und ohne kotransfizierter MaxiK- β_1 -cDNS. Ausgehend von einem Haltepotential von -80mV wurden in 20mV -Schritten Messpotentiale zwischen -120 und $+140\text{mV}$ stufenweise angelegt und die resultierenden Ströme im excised patch (inside-out Konfiguration) registriert. Das Balkendiagramm zeigt die mittleren Stromamplituden bei den angegebenen Messpotentialen nach Transfektionen von MaxiK- $\alpha\Delta S8$ ($n=10$), $\Delta S8 + \beta_1$ ($n=17$), lacZ ($n=5$) und lacZ + β_1 ($n=6$). Die Ca^{2+} -Konzentration im Bad betrug $100\mu\text{M}$.

Um einen Überblick über einen erweiterten Potentialbereich zu erhalten, wurde bei den vier angegebenen Potentialen ausgewertet. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen $\alpha\Delta S8$ - und lacZ-transfizierten HE293-Zellen in Abhängigkeit vom ausgewerteten Potentialbereich (siehe Tab.5).

mV	-120	+80	+120	+140
$\alpha\Delta S8$ [pA]	-7,7±1,6	21,8±5,4	28,4±4,1	34,5±3,8
lacZ [pA]	-7,8±3,3	9,9±1,8	14,5±1,9	17,9±0,5
p-Wert	0,98	0,11	0,02	0,03

Tabelle 5: Zusammenfassung des Vergleichs der Stromamplituden von $\alpha\Delta S8$ - bzw. lacZ-transfizierten HEK293-Zellen. Zur Signifikanzanalyse (ANOVA) wurden die p-Werte aus dem Vergleich der jeweiligen Stromamplituden ermittelt.

Während bei negativen Potentialen kein Unterschied zwischen den transfizierten Zellen besteht (was wahrscheinlich auf einer Überlagerung der Kaliumleitfähigkeit durch endogene einwärts-rektifizierende K_{ir} -Kanäle beruht), wird der Unterschied bei positiven Potentialen deutlich und oberhalb +120mV signifikant. Dies steht in Übereinstimmung mit einer spannungsabhängigen Aktivierung des BK Kanals, die demnach auch eine Eigenschaft der $\alpha\Delta S8$ -Spleißvariante darstellen könnte.

Nichtsdestotrotz ist der beobachtete Effekt des $\alpha\Delta S8$ -Proteins klein; die Koexpression des BK- β_1 -Untereinheit eliminiert den Unterschied zwischen $\alpha\Delta S8$ - und lacZ-transfizierten Zellen, denn das β_1 -Protein erzeugt *per se* eine Erhöhung der Stromamplitude in Übereinstimmung mit Abb.26B.

3.2.3.2 Immunzytochemischer Nachweis des MaxiK- $\alpha\Delta S8$ -Proteins in transient transfizierten HEK293-Zellen

Um den intrazellulären Transport und die Lokalisation der Spleißvariante zu studieren, wurden im folgenden Immunfluoreszenz-Untersuchungen durchgeführt.

Von entscheidender Bedeutung für eine aussagekräftige Immunzytochemie ist in erster Linie der primäre Antikörper gegen das Target-Protein. Da die kommerziell erhältlichen Antikörper gegen MaxiK α nur von unzureichender Qualität waren, wurde auf die Methode der Antigen-Markierung (engl. „epitope tagging“) zurückgegriffen: Dabei wird eine kurze antigene-Sequenz mit dem Target-Protein fusioniert, das dann mittels Antikörpern gegen das angefügte Epitop nachgewiesen werden kann. Für die vorliegende Arbeit wurden sowohl FLAG- als auch HA-Epitope verwendet, die durch die in Abb.28 dargestellten Klonierungsschemata sowohl mit der MaxiK- $\alpha\Delta S8$ als auch der MaxiK- α -wt-cDNS gekoppelt wurden.

Um eine Lokalisation der Kanalproteine an der Plasmamembran zweifelsfrei nachzuweisen, wurde der Umstand ausgenutzt, dass der Aminoterminus des MaxiK- α -Proteins extrazellulär liegt, was durch die Existenz der zusätzlichen Transmembrandomäne S0 verursacht wird. Eine Fusion des künstlichen Epitops mit dem 5'-Ende präsentiert das Antigen daher außerhalb der Zelle, sodass es bei geeigneter Versuchsdurchführung von intrazellulären Antigenen unterschieden werden kann.

Zunächst wurde in dieser Arbeit die FLAG-Sequenz und der dazugehörige Antikörper verwendet; da das Ergebnis bezüglich Sensitivität und Spezifität jedoch unzureichend war (Daten nicht gezeigt) wurde im weiteren Verlauf auf HA-gekoppelte Konstrukte zurückgegriffen. Mit diesem Epitop wurde die Lokalisation von MaxiK- α Δ S8 und -wt immunzytochemisch unter permeabilisierenden Bedingungen miteinander verglichen (siehe 2.4.3).

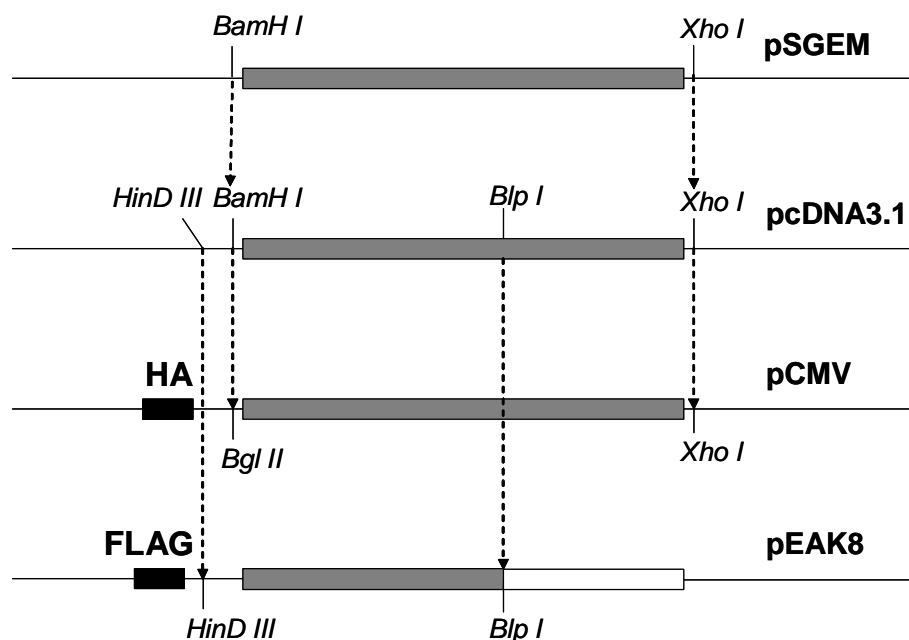


Abb. 28: Markierung der MaxiK- α mit HA- bzw. FLAG-Epitop. Die Darstellung ist nicht maßstabsgerecht. Ausgehend von einem pSGEM-BK- α -Konstrukt wurde unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *BamH I* und *Xho I*, die in der MCS des Vektors schneiden, die gesamte α -cDNS entfernt und über dieselben Schnittstellen in pcDNA3.1 bzw. über zuvor mit *Bgl II* und *Xho I* geöffneten pCMV-HA eingefügt. Letzterer besitzt zwischen Promotor und MCS eine HA-Sequenz, die N-terminal mit α Δ S8-cDNS fusioniert wird. Für die entsprechende Markierung mittels des FLAG-Epitops wurde aus pcDNA3.1- α Δ S8 mit Hilfe von *Hind III* (schneidet in der MCS) und *Bln I* (schneidet in α Δ S8 hinter der Domäne S8 bei nt 2110) ein 2,1kb großes Fragment in peak8-FLAG- α -wt überführt, der bereits vorhanden war. Die Produkte wurden zum Abschluss kontrollsequenziert.

Wie Abbildung 29 zeigt, weisen Wildtyp und Spleißvariante unter diesen Bedingungen eine übereinstimmende Verteilung auf. Beide Proteine werden in hohem Maße überexprimiert und scheinen über die gesamte Zelle verteilt zu sein, inklusive der Organellen wie dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat. Eine unspezifische Färbung kann aus-

geschlossen werden, da im Gegensatz zur GFP-Fluoreszenz keine Färbung im Zellkern nachgewiesen wurde. Allerdings konnte über eine mögliche Membranfärbung keine Aussage gemacht werden. Im weiteren Verlauf wurden daher Versuche ohne Triton im Inkubationspuffer durchgeführt, so dass keine Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte und die Primärantikörper nur Epitope an der Zellaussenseite, aber nicht innerhalb der Zelle erkennen konnten.

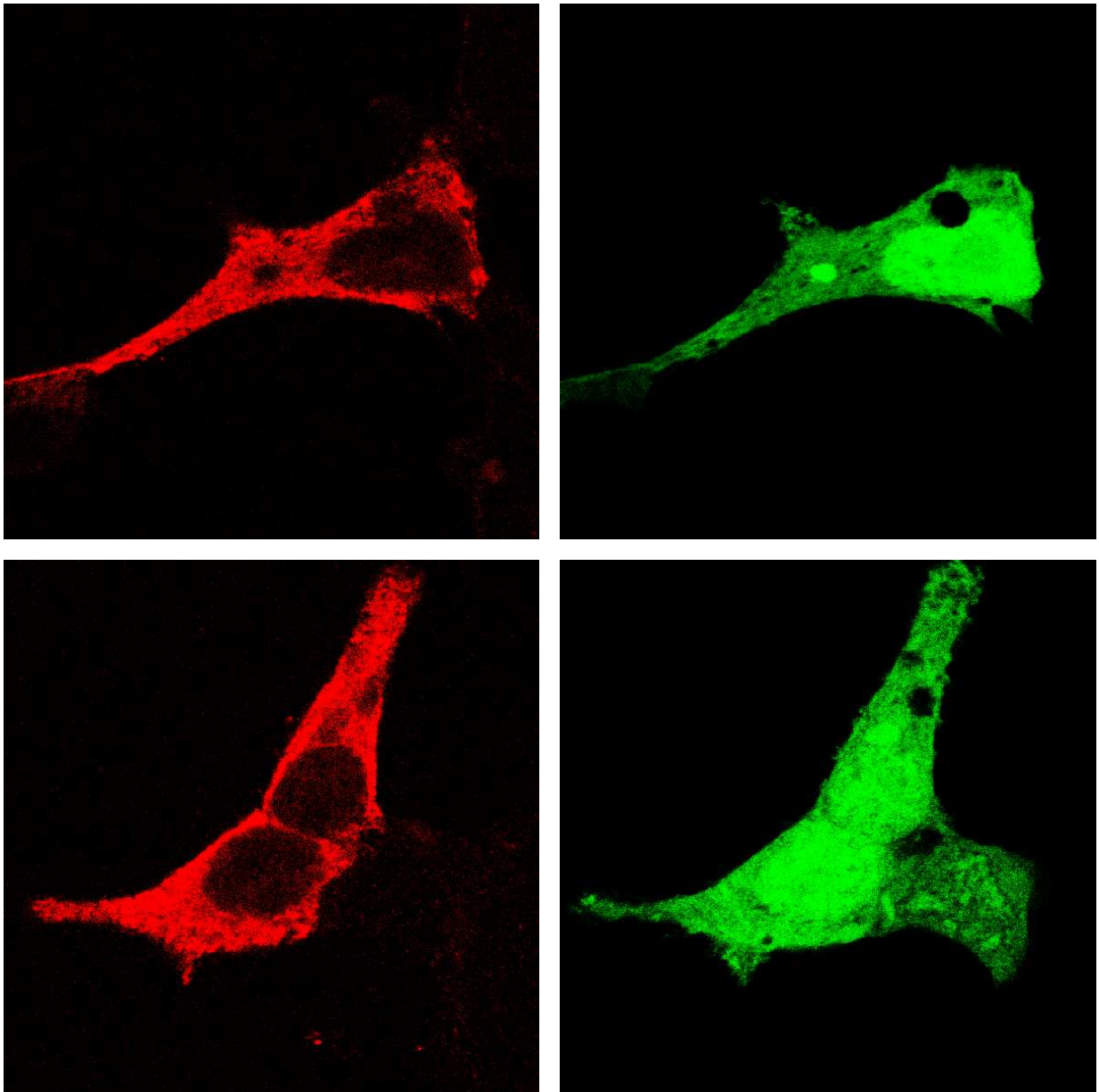


Abb. 29: Immunzytochemischer Nachweis der Expression von MaxiK-wt bzw. - $\alpha\Delta S8$ in transient transfizierten HEK293-Zellen unter permeabilisierenden Bedingungen. Dargestellt sind Aufnahmen mittels konfokaler Mikroskopie von HA-MaxiK-wt (oben) und HA-MaxiK- $\alpha\Delta S8$ (unten). Zum Nachweis des Hämagglutinin(HA)-Epitops (links) wurde als Erstantikörper Anti-HA High Affinity aus der Ratte (Roche Biomedicals, Mannheim) und als Sekundärantikörper Alexa Fluor® 546 goat anti-rat (Mo Bi Tec, Göttingen) verwendet. Jeweils rechts dargestellt die jeweilige GFP-Fluoreszenz zur Transfektionskontrolle.

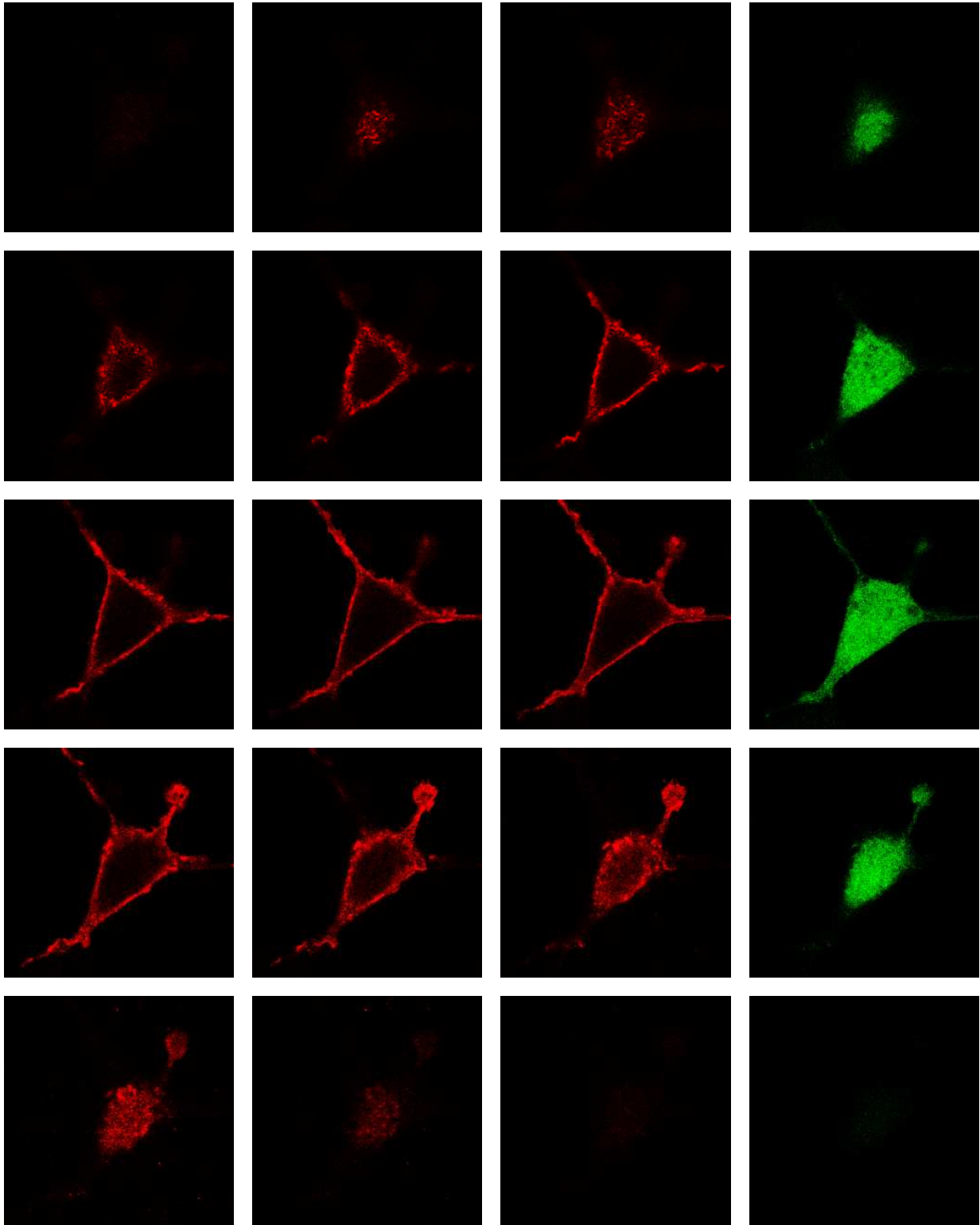


Abb. 30: Immunzytochemischer Nachweis der MaxiK-wt-Expression in transient transfizierten HEK293-Zellen unter nicht-permeabilisierenden Bedingungen. Dargestellt sind aufeinander folgende Aufnahmen als „optische Schnitte“ der XY-Ebene entlang der Z-Achse von links oben nach rechts unten. Zum Nachweis des HA-tags (links) wurde als Erstantikörper Anti-HA High Affinity aus der Ratte (Roche Biomedicals, Mannheim) und als Sekundärantikörper Alexa Fluor® 546 goat anti-rat (Mo Bi Tec, Göttingen) verwendet. Rechts dargestellt die das Zytoplasma markierende GFP-Fluoreszenz des jeweils links benachbarten Schnittes.

Mit Hilfe dieser Methode gelang es die Lokalisation von MaxiK- α -wt an der Zellmembran von HEK293-Zellen nachzuweisen. Abbildung 30 zeigt eine Reihe von optischen Schnitten, die die spezifische Anfärbung der Zellmembran in MaxiK- α -wt transfizierten Zellen verdeutlichen. Unter analogen Bedingungen wurde die Lokalisation der Spleißvariante überprüft (siehe Abb. 31). Im Gegensatz zum Wildtyp konnte im Falle der $\alpha\Delta$ S8-Variante niemals (n=18) eine distinkte Fluoreszenz an der Zellaussenseite detektiert werden.

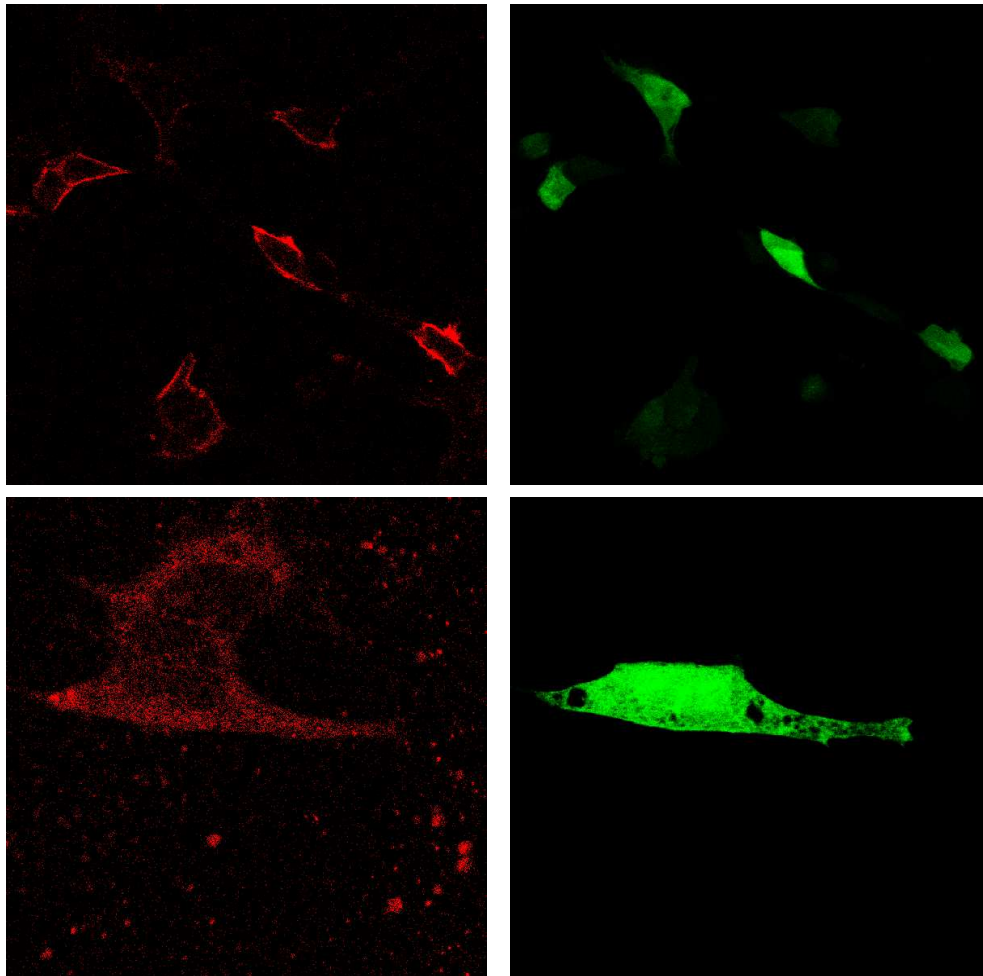


Abb. 31: Immunzytochemischer Nachweis der MaxiK- $\alpha\Delta$ S8-Expression in transient transfizierten HEK293-Zellen unter nicht-permeabilisierenden Bedingungen. Dargestellt sind Aufnahmen mittels konfokaler Mikroskopie von HA-MaxiK-wt (oben) und HA-MaxiK- $\alpha\Delta$ S8 (unten). Zum Nachweis des HA-Epitops (links) wurde als Erstantikörper Anti-HA High Affinity aus der Ratte (Roche Biomedicals, Mannheim) und als Sekundärantikörper Alexa Fluor® 546 goat anti-rat (Mo Bi Tec, Göttingen) verwendet. Die Abbildungen wurden nachträglich aufgehellt. Jeweils rechts dargestellt die GFP-Fluoreszenz zur Transfektionskontrolle.

Diese Ergebnisse zeigen eine wesentliche Beeinträchtigung des Transportes der Δ S8-Variante an die Plasmamembran, die der verminderten Leitfähigkeit im Vergleich zum BK-Wildtyp zugrunde liegt. Aufgrund der limitierten Sensitivität der Immunfluoreszenz-Methodik konnte die geringe Expression, die elektrophysiologisch nachgewiesen wurde, nicht zweifelsfrei detektiert werden.

3.2.4 Dominanz-Negativ-Analyse des MaxiK- $\alpha\Delta S8$ -Proteins in *Xenopus laevis* Oozyten und HEK293-Zellen

Zarei und Kollegen (Zarei *et al.*, 2001) konnten in ihrer Untersuchung der MaxiK- α -Spleißvariante MaxiK-SV1 zeigen, dass diese mit koexprimiertem Wildtyp im Golgi-Apparat von HEK293-Zellen koassemblierten, was eine Retention des Wildtyps zur Folge hatte. Auf diesem dominant-negativen Effekt des SV1-Proteins basierend, schlossen sie auf die physiologische Relevanz einer Spleißvarianten-induzierten Inhibition des MaxiK Kanals.

In Analogie zu diesen Experimenten wurde die Koexpression von MaxiK- $\alpha\Delta S8$ und -Wildtyp auf einen dominant-negativen Effekt hin überprüft.

3.2.4.1 Elektrophysiologische Untersuchungen in *Xenopus* Oozyten

Zu diesem Zweck wurden gleiche Mengen an MaxiK- α -wt oder - $\alpha\Delta S8$ -RNS in *Xenopus* Oozyten koinjiziert; im Experiment zur negativen Dominanz wurde jeweils die Hälfte der beiden Isoformen eingesetzt. Als weitere Kontrolle diente die Injektion von Wildtyp-RNS in der Menge, wie sie im Koexpressionsexperiment eingesetzt wurde (das fehlende Volumen wurde durch Wasser ausgeglichen, siehe Abb.33).

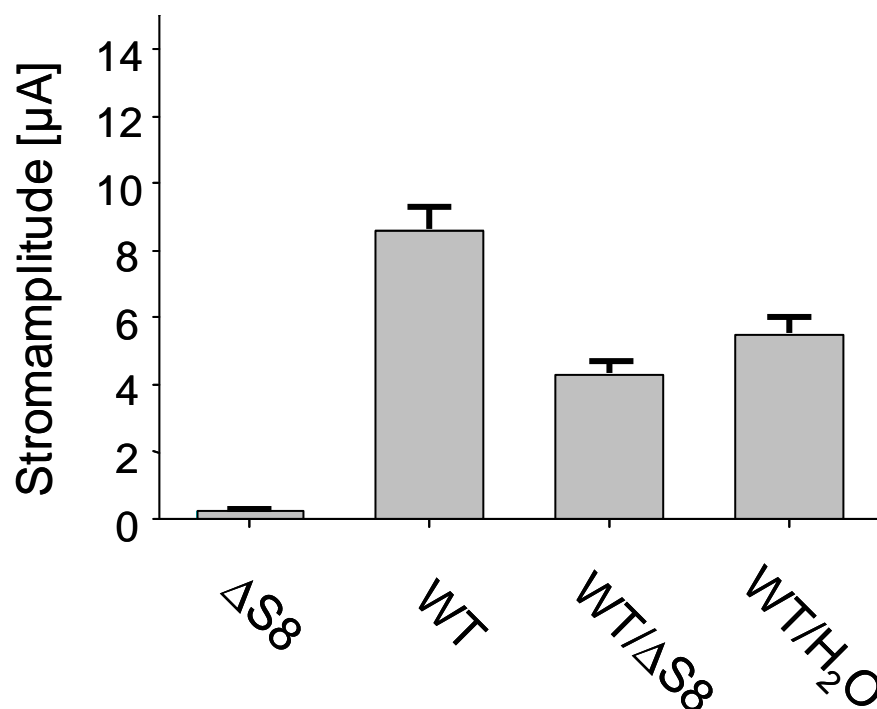


Abb. 33: TEVC von MaxiK- α -cDNS in *Xenopus laevis* Oozyten. Gemittelte Stromamplituden der Koexpression von MaxiK-wt und MaxiK- $\alpha\Delta S8$ im Vergleich mit den jeweiligen Einzelexpressionen. Pro Experiment (Oozyte) wurden jeweils 7,5ng RNS in 50nl injiziert. (n=54 bei MaxiK- $\alpha\Delta S8$, n=59 bei MaxiK-wt) Bei Kotransfektionen enthielt dieser Ansatz entsprechend jeweils die Hälfte beider Komponenten. Im Falle des WT/ H_2O -Versuchs also 3,75ng wt-RNS in 25nl und 25nl H_2O (n=71), im Falle des WT/ $\Delta S8$ -Versuchs 3,75ng wt-RNS in 25 μl H_2O und 3,75ng - $\alpha\Delta S8$ RNS in 25 μl H_2O (n=68).

Wie Abb.33 veranschaulicht, konnte im Falle der Koexpression von Wildtyp- und $\alpha\Delta S8$ -cDNS die Stromdichte etwa um die Hälfte gegenüber dem Wert bei Verwendung des Wildtyps alleine reduziert werden (dies entspricht der jeweils injizierten Menge von wt RNS). Es besteht daher kein ausgeprägter dominant-negativer Effekt. Die Verringerung der Stromamplitude im Vergleich zu Wildtyp/H₂O-injizierten Oozyten beruht wahrscheinlich auf einer Saturierung der Translationsmaschinerie der Eizelle bei Verwendung grösserer Mengen von RNS.

3.2.4.2 Immunzytochemische Untersuchungen in HEK293-Zellen

Die Kotransfektion MaxiK- α -wt und MaxiK- $\alpha\Delta S8$ wurde im immunzytochemischen Experiment wiederholt, um eine Beeinflussung des Membrantransportes beider Proteine durch ihre mögliche Interaktion zu untersuchen. Darüber hinaus wurde getestet, ob die β_1 -Untereinheit einen Effekt in diesem experimentellen Ansatz zeigt. In diesen Versuchen wurde Epitopmarkiertes $\alpha\Delta S8$ -Protein verwendet, während α -wt und β_1 unmodifiziert blieben. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass alle Fluoreszenzsignale auf die Spleißvariante zurückzuführen waren.

Es konnte gezeigt werden, dass weder die Koexpression des Wildtyp (Abb. 34 oben) noch die von Wildtyp plus β_1 -Protein (Abb.34unten) den Einbau von BK- $\alpha\Delta S8$ in die Plasmamembran fördert. Stattdessen konnte wie zuvor die Expression nur intrazellulär detektiert werden (Abb.31, 3.2.3.2). Auch die Verwendung verschiedener Mischungsverhältnisse von wt- und $\Delta S8$ -Vektoren, um die Bildung von Heteromeren mit unterschiedlichen Anteilen der jeweiligen Proteine zu erzeugen, erbrachte keine Verstärkung des Fluoreszenzsignals an der Plasmamembran.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass ein Kotransport zur Plasmamembran von Spleißvariante und MaxiK- α -wt bzw. dem Wildtyp sowie dem β_1 -Hilfsprotein mit den eingesetzten Techniken nicht ermittelt werden konnte.

In Anlehnung an die zuvor durchgeführten immunozytochemischen Untersuchungen wurde die Koexpression von Wildtyp und $\alpha\Delta S8$ -Variante nun so durchgeführt, dass der Wildtyp HA-markiert wurde ($\alpha\Delta S8$ wurde ebenfalls markiert belassen, da diese Untereinheit die Plasmamembran nicht erreicht, s.o.). Dieses Experiment zielte darauf ab, eine Retention der HA-fusionierten –MaxiK- α -wt-Untereinheit durch die Spleißvariante nachzuweisen.

Um eine quantitative Abschätzung vornehmen zu können, wurden in diesem Experiment exakt gleiche DNS-Konzentrationen transfiziert; im Kontrollversuch wurde pCMV-MaxiK- $\alpha\Delta S8$ durch pcDNA3.1-lacZ ersetzt.

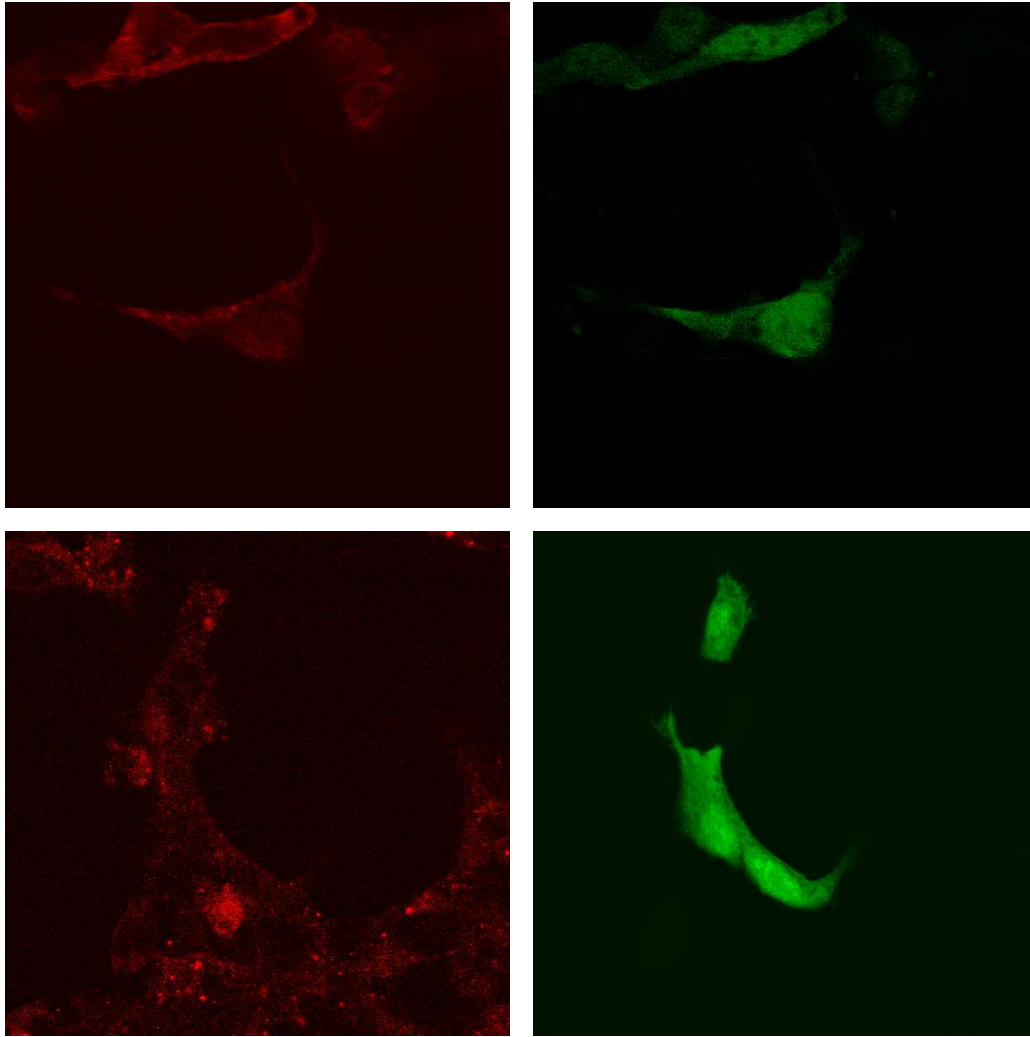


Abb. 34: Koexpression von HA-MaxiK- $\alpha\Delta S8$ und -wt mit und ohne β_1 . Dargestellt sind Aufnahmen mittels konfokaler Mikroskopie von MaxiK-wt und HA-MaxiK- $\alpha\Delta S8$ (oben) sowie MaxiK-wt, HA-MaxiK- $\alpha\Delta S8$ plus β_1 (unten) unter nicht-permeabilisierenden Bedingungen. Zum Nachweis des HA-tags (links) wurde als Primärantikörper Anti-HA High Affinity aus der Ratte (Roche Biomedicals, Mannheim) und als Sekundärantikörper Alexa Fluor® 546 goat anti-rat (Mo Bi Tec, Göttingen) verwendet. Die Abbildungen wurden nachträglich aufgehellt. Jeweils rechts dargestellt die GFP-Fluoreszenz zur Transfektionskontrolle.

Die in Abb.35 dargestellten Verhältnisse sind repräsentativ für jeweils mindestens zehn Zellen in drei unabhängigen Experimenten. In keinem der betrachteten Fälle konnte eine verminderte Lokalisation des Wildtyps an der Zellmembran nach Koexpression mit der $\Delta S8$ -Variante detektiert werden.

Beide α -Proteine scheinen also nicht im Sinne einer Heteromultimerbildung in HEK293-Zellen zu interagieren. Dies könnte bedeuten, dass die S8-Domäne die Interaktionsstelle für die Assemblierung mit anderen α -Untereinheiten darstellt; um diese Hypothese zu überprüfen, wurde daher die Stöchiometrie der exprimierten MaxiK Kanäle näher untersucht.

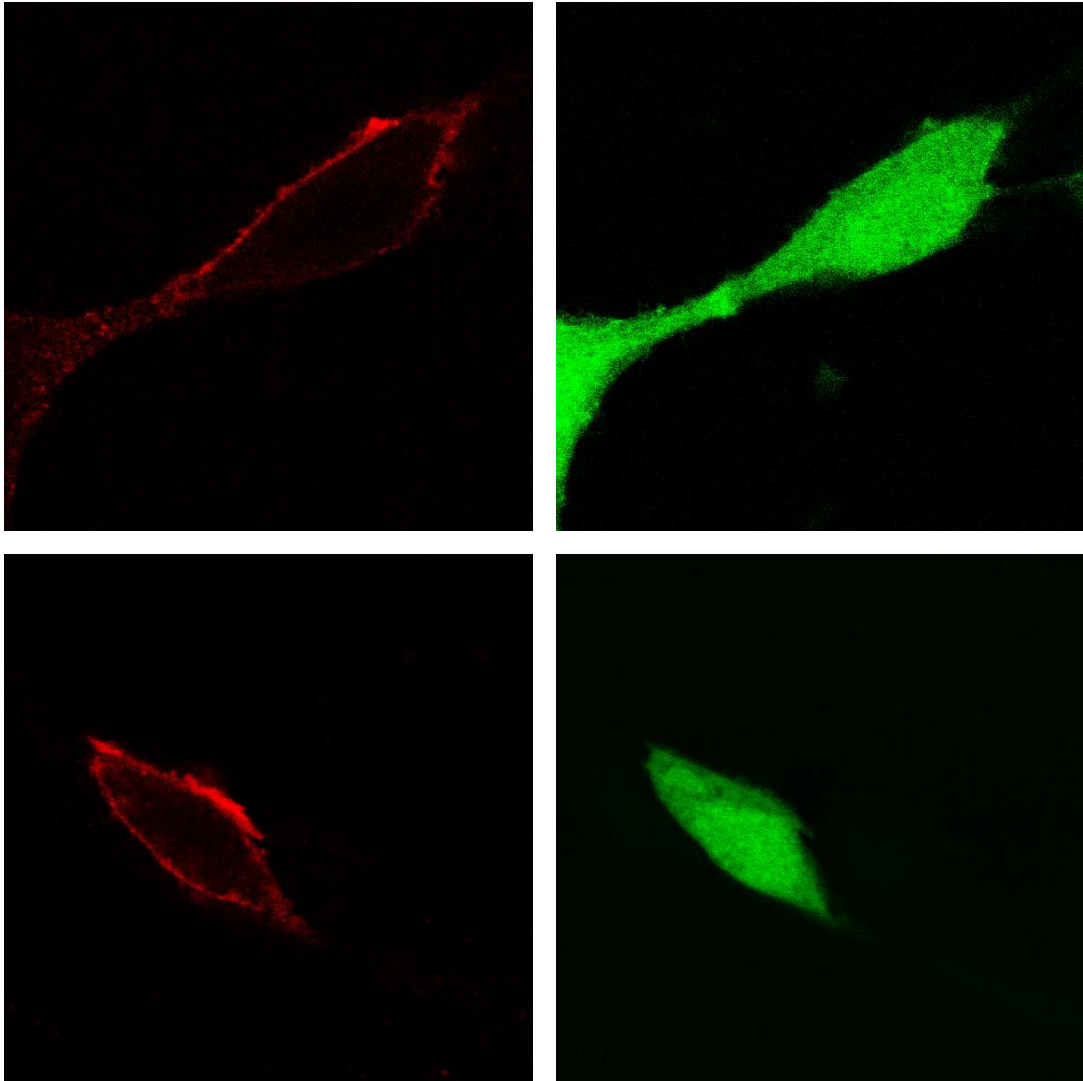


Abb. 35: Koexpression von HA-MaxiK-wt und MaxiK- $\alpha\Delta S8$ bzw. HA-MaxiK-wt und lacZ. Dargestellt sind Aufnahmen mittels konfokaler Mikroskopie von HA-MaxiK-wt und HA-MaxiK- $\alpha\Delta S8$ (oben) und HA-MaxiK-wt und lacZ (unten) unter nicht-permeabilisierenden Bedingungen. Zum Nachweis des HA-Epitops (links) wurde als Primärantikörper Anti-HA High Affinity aus der Ratte (Roche Biomedicals, Mannheim) und als Sekundärantikörper Alexa Fluor® 546 goat anti-rat (Mo Bi Tec, Göttingen)) verwendet. Jeweils rechts dargestellt sind die GFP-Fluoreszenzen der Transfektionskontrollen.

3.2.5 Analyse der Stöchiometrie von MaxiK- $\alpha\Delta S8$ -Multimeren in HEK293-Zellen

Zunächst wurde in Analogie zur Analyse von MaxiK-rbslo2 (Wang *et al.*, 2003) die Assemblierung der α -Untereinheiten zu funktions- und transportfähigen Kanal-Homotetrameren biochemisch untersucht.

Um den Assoziationsgrad der Untereinheiten nachzuweisen, wurden HEK293-Zellen mit HA-gekoppelten MaxiK- $\alpha\Delta S8$ bzw. -wt-Vektorkonstrukten transient transfiziert und in einem nicht-reduzierenden Puffer (mit 1% Triton X-100) lysiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Immobilisierung wurden die Proteinbanden mit Anti-HA-Primärantikörper inku-

biert und die entstandenen Kanalkomplexe über die Biolumineszenz des Sekundärantikörpers nachgewiesen. Abb.36 beschreibt die Immundetektion von mono- und oligomeren $\alpha\Delta S8$ - und Wildtyp-Proteinen in dem Lysat von transient transfizierten HEK293-Zellen.

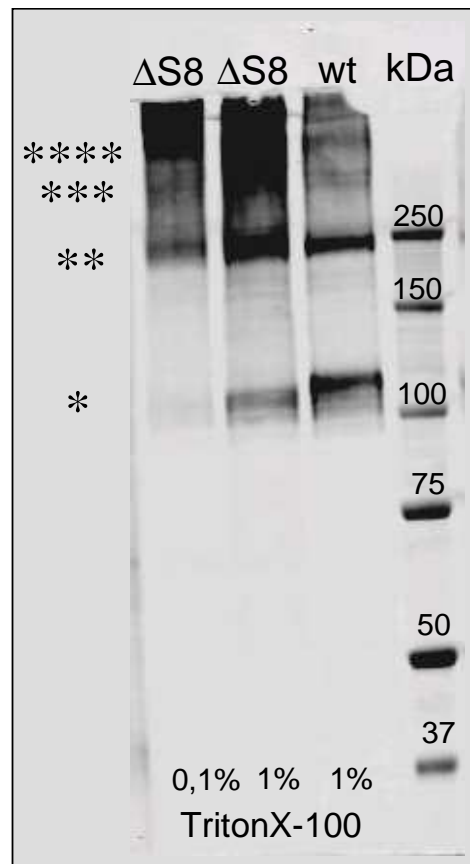


Abb.36: Immundetektion von MaxiK-wt und - $\alpha\Delta S8$ in transient transfizierten HEK293-Zellen nach Extraktion mit TritonX-100. Aufgetragen sind Zelllysatspräparationen, die durch die angegebenen Zusätze von TritonX-100 zum Extraktionspuffer erhalten wurden. Spur 1 und 2 stammen aus Präparationen von transient mit BK- $\alpha\Delta S8$ -cDNS transfizierten HEK293-Zellen, Spur 3 von der entsprechenden Wildtypkontrolle. Nach Vorinkubation für 15 min bei 37°C wurden die Proteine gelelektrophoretisch in einem 4-12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (bezüglich Auftrennung, Blotting und Immundetektion, siehe 2.7); zur Größenordnung wurde in Spur 4 der Proteingrößenmarker (Biorad, München) aufgetragen. Auf der linken Seite der Abbildung markieren die Sterne die erwarteten Laufpositionen von Mono-, Di-, Tri- und Tetrameren der BK- α -Untereinheiten.

Das Monomer der Spleißisoform läuft gegenüber dem Wildtyp im linearen Polyacrylamid-Gel aufgrund der Deletion von 24 Aminosäuren (entspricht einer molekularen Masse von etwa 7,9kDa) bei einer etwas geringeren Größe. Unter den angewandten milden, nicht-reduzierenden Solubilisierungsbedingungen bleiben die assemblierten Kanalkomplexe weitgehend erhalten, so dass die Assoziation von Oligomeren erkannt werden kann. Oligomere unterschiedlicher molekularer Massen werden sowohl in $\alpha\Delta S8$ -exprimierenden Zellen als auch in Wildtyp-exprimierenden Zellen erkannt. Wie die Färbung bei 360kDa zeigt, bildet die Spleißvariante Tetramere, die sich in ihrer Häufigkeit nicht vom Wildtyp unterscheiden.

Um die multimere Struktur der detektierten Banden zu überprüfen, wurden Proteinproben vor dem Auftragen für 15min in Auftragepuffer inkubiert, dem 3% β -Mercaptoethanol zugesetzt worden war. Dieses Reagenz reduziert die Sulfidbrücken, die assemblierte Proteinstrukturen fixieren. Infolgedessen detektiert der Antikörper in diesen Präparationen im wesentlichen nur die Monomere beider MaxiK- α -Isoformen (Abb. 37, Spur 1 und 2). Dies kann als Beleg dafür gelten, dass es sich bei den schwereren Banden in den nicht-reduzierenden Präparationen tatsächlich um Multimere der α -Untereinheiten handelt.

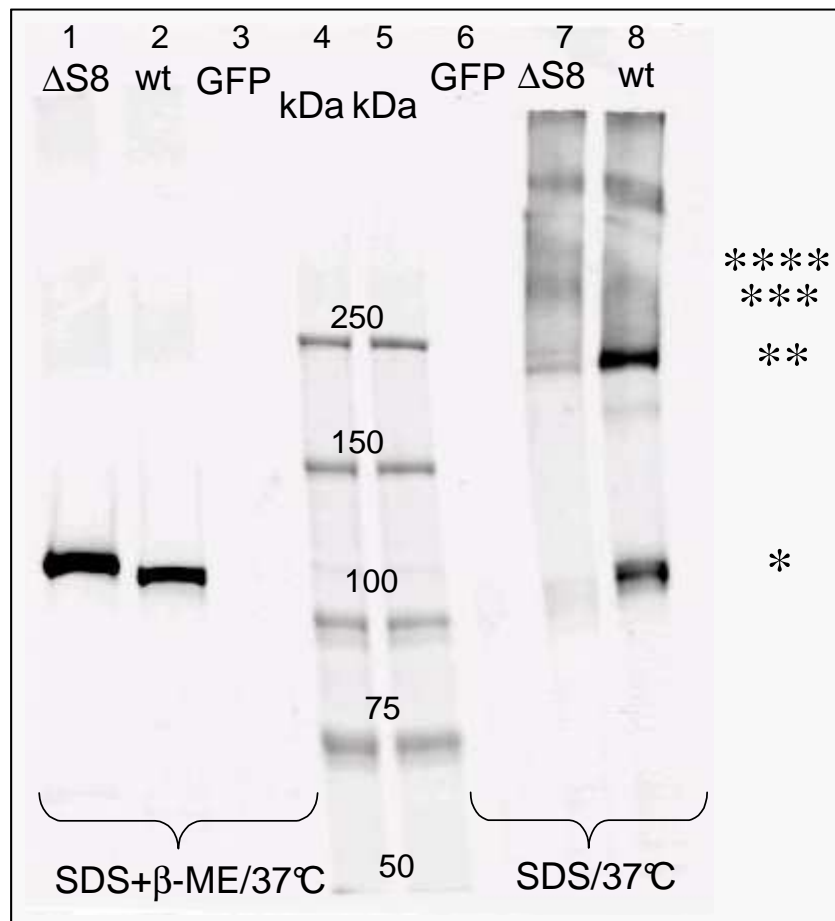


Abb.37: Immundetektion von MaxiK- α -Untereinheiten in transient transfizierten HEK293-Zellen nach Extraktion mit SDS. Die Zellen wurden transient mit den jeweiligen cDNS von BK- α Δ S8 (Spur 1+7), BK- α -wt (Spur 2+8) oder einer GFP-Kontrolle (Spur 3+6) transfiziert. Aufgetragen sind Zellysatpräparationen, die nach Extraktion mit 0,1%SDS für 20min bei 37°C erhalten wurden (Spur 6-8) und solche, bei denen während der Extraktion 3% β -Mercaptoethanol eingesetzt wurde (Spur 1-3). Spur 1, 2 und 3 stammen dabei aus Präparationen von transient mit BK- α Δ S8-cDNS transfizierten HEK293-Zellen, Spur 3 von der entsprechenden Wildtypkontrolle. Nach Extraktion für 15 min bei 37°C wurden die Proteine gelelektrophoretisch in einem 6%igen Polyacrylamidgelel aufgetrennt (bezüglich Auftrennung, Blotting und Immundetektion, siehe 2.7); zur Größenzuordnung wurde in den Spuren 5 und 6 der Proteingrößenmarker (Biorad, München) aufgetragen. Auf der rechten Seite der Abbildung markieren die Sterne die erwarteten Laufpositionen von Mono-, Di-, Tri- und Tetrameren der BK- α -Untereinheiten.

Durch diese Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die Spleißvariante MaxiK- α Δ S8 nach wie vor die Fähigkeit zur Homomultimer-Bildung besitzt. Demnach liegt die Bedeutung

der S8-Domäne nicht in der Untereinheiten-Assemblierung. Es blieb jedoch weiterhin ungeklärt, warum das Multimer nicht zur Plasmamembran transportiert wird. Daher wurde der intrazelluläre Transport und die Retention des Kanalkomplexes im endoplasmatischen Retikulum detaillierter untersucht.

3.2.6 Analyse der MaxiK- $\alpha\Delta$ S8-Lokalisation nach Mutation des carboxyterminalen RLR-Motivs

Die Assemblierung von Untereinheiten für Plasmamembranproteine mit Oligomerstruktur findet typischerweise im ER statt (Nagaya & Papazian, 1997; Zerangue *et al.*, 1999). Die Zelle besitzt dabei Selektionsmechanismen, die es ihr ermöglichen, Proteine in bestimmte Kompartimente zu dirigieren, sowie nicht oder unvollständig aggregierte Proteine im ER zurückzuhalten. So kann durch die Exposition von Retentionssignalen (Teasdale & Jackson, 1996) der Angriff von Chaperon-Proteinen erfolgen, die einen Proteinkomplex an seinem Transport zur Plasmamembran hindern. Im Anschluss an die Analyse zur Heteromerbildung von MaxiK- $\alpha\Delta$ S8 und –wt wurde daher die Retention der Spleißvariante näher untersucht.

Die am besten charakterisierten Retentionsmotive für die Sortierung und den Transport von Proteinen im ER und im Golgi-Apparat sind das zytosolische Di-Lysin-Signal (-KKXX-), das luminaire –KDEL- sowie das Di-Arginin-Motiv –RXR-, wobei die Bedeutung benachbarter Aminosäurereste weitgehend ungeklärt ist (Zerangue *et al.*, 2000). Eine Analyse der carboxyterminalen Sequenz identifizierte das RLR-Triplett an Position 1015 der Aminosäuresequenz als aussichtsreichen Kandidat für ein endständiges Retentionssignal. Mutation dieser Sequenz zu –AAA- mit Hilfe der Methode der „overlap extension PCR“ (Ho *et al.*, 1989) unter Verwendung der in 2.1.7.2 angegebenen Oligonukleotide MaxiKOutF, MaxiKAAAF, MaxiKA-AAR und CL29 und Klonierung des finalen PCR-Produktes in Vektorkonstrukte mit pCMV-HA-MaxiK- $\alpha\Delta$ S8 und –wt-cDNA wurden freundlicherweise von Dipl. Biol. Florian Bundis durchgeführt. Nach transienter Expression der jeweiligen AAA-Mutanten in HEK293-Zellen konnte weder für den Wildtyp noch für die Spleißisoform immunzytochemisch eine Expression an der Plasmamembran nachgewiesen werden (n= 15 Zellen in 3 Experimenten, Daten nicht gezeigt). Dies belegt, dass das RLR-Motiv auf intrazelluläre Transportprozesse Einfluss nimmt, dieser Effekt allerdings unabhängig von der S8-Domäne ist.

3.2.7 Immunzytochemische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation des MaxiK- $\alpha\Delta S8$ -Proteins in HEK293-Zellen

Bei der Suche nach den Ursachen für die Retention der $\alpha\Delta S8$ -Variante wurde nun die Hypothese in Betracht gezogen, dass das Fehlen der S8-Domäne die Interaktion mit essentiellen Transportproteinen ändert bzw. die Spleißvariante mit anderen Transportproteinen wechselwirkt als der Wildtyp. Dies könnte dazu führen, dass MaxiK- $\alpha\Delta S8$ in ein anderes zelluläres Kompartiment als die Plasmamembran gelangt, oder dass der (Membran-)Transport nur in bestimmten Zellen, in denen das Protein nativ exprimiert wird, möglich ist. Diese beiden Möglichkeiten wurden im folgenden näher untersucht.

Obwohl heftig umstritten, gibt es in der Literatur Hinweise auf die Existenz eines mitochondrialen MaxiK Kanals, der sich im Vergleich zum plasmamembranären Protein durch eine veränderte Pharmakologie auszeichnet (Xu *et al.*, 2002). Die innere Mitochondrienmembran besitzt ein kontrolliertes, physiologisch bedeutsames Potential, welches durch Ca^{2+} moduliert wird; zu beiden Seiten der Membran existiert ein Kaliumgradient. Daher wäre die Anwesenheit eines (wie auch immer gearteten) MaxiK Kanals in diesem Zellkompartiment grundsätzlich von grosser Bedeutung.

Da unter permeabilisierenden Bedingungen aufgrund der Überexpression von pCMV-MaxiK-HA- $\alpha\Delta S8$ eine starke Anfärbung des gesamten Intrazellulärbereiches registriert worden war (siehe 3.2.3.2), konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob eine Inkorporation des Proteins in mitochondriale Membranen stattgefunden hatte. Um dies zu überprüfen, wurde die Kolo-kalisation der $\alpha\Delta S8$ -Splicevariante mit dem Mitochondrien-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Deep Red (Molecular Probes) durch eine Zwei-Kanal-Messung am konfokalen Mikroskop untersucht (siehe 2.5).

Die blau fluoreszierenden Bereiche in Abbildung 38 markieren die durch MitoTracker Deep Red gefärbten Mitochondrien der einzelnen Zellen. Käme es zu einer vermehrten Anhäufung des MaxiK-Wildtyp- oder Spleiß-Variante in den Mitochondrien, so würde eine Überlagerung der blauen und roten Fluoreszenzemission detektiert werden. Das in den Mitochondrien angereicherte Protein sollte daher eine Violett-färbung aufweisen. Wie Abb.37 zeigt, sind blaue und rote Bereiche nahezu vollständig getrennt, sowohl für den Wildtyp, wie erwartet, als auch für die MaxiK- $\alpha\Delta S8$ Variante.

Damit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei MaxiK- $\alpha\Delta S8$ um eine mitochondrial exprimierte MaxiK-Untereinheit handelt.

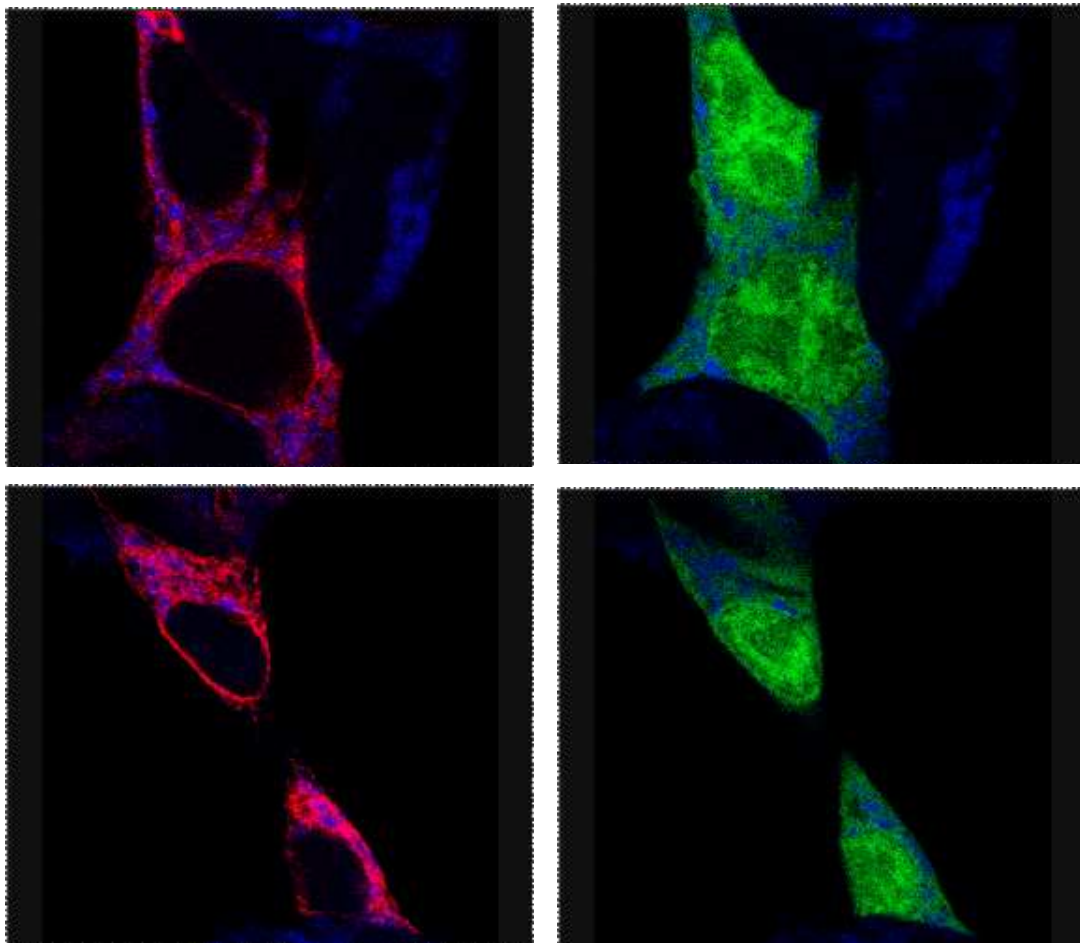


Abb. 38: Mitochondrienfärbung in mit HA-MaxiK-wt und HA-MaxiK- $\alpha\Delta$ S8 transfizierten HEK293 Zellen. Dargestellt sind Aufnahmen mittels konfokaler Mikroskopie von HA-MaxiK-wt (unten) und HA-MaxiK- $\alpha\Delta$ S8 (oben) unter permeabilisierenden Bedingungen. Die Zellen wurden vor der Immunfärbung 20min mit 200nM Mitotracker Deep Red 633 vorinkubiert, um die Mitochondrien darzustellen. Zum Nachweis des HA-Epitops (links) wurde als Erstantikörper Anti-HA High Affinity aus der Ratte (Roche Biomedicals, Mannheim) als Sekundärantikörper Alexa Fluor® 546 goat anti-rat (MoBiTec, Göttingen) verwendet. Jeweils rechts dargestellt sind die GFP-Fluoreszenzen der Transfektionskontrollen.

3.2.8 Immunzytochemische Untersuchungen zur Expression des MaxiK- $\alpha\Delta$ S8-Proteins in Glattmuskel- und Endothelzellen

Die $\alpha\Delta$ S8 Variante wurde aus einer Herz-cDNS-Bank kloniert und ist daher in diesem Gewebe exprimiert. Ein exakter Nachweis des zellulären Expressionsmusters konnte aufgrund nicht verfügbarer Antikörper und sensitiver Hybridisierungssonden in dieser Arbeit nicht erbracht werden.

In Analogie zum Wildtypkanal kann jedoch vermutet werden, dass auch MaxiK- $\alpha\Delta$ S8 in Gefäßzellen exprimiert wird. Daher wurde der Membrantransport von MaxiK- $\alpha\Delta$ S8 in Endothel-

und Glattmuskelzellen untersucht. Als Endothelzellmodell wurden EAhy926, eine Hybridom-Zelllinie aus HUVEC⁸ Zellen und Lungenkarzinomazellen genutzt.

HA-markierte MaxiK-wt- bzw. - $\alpha\Delta S8$ -Proteine wurden sowohl unter permeabilisierenden als auch nicht-permeabilisierenden Bedingungen angefärbt und die Immunfluoreszenzen am konfokalen Mikroskop ausgewertet. Im letzteren Fall konnte kein $\alpha\Delta S8$ -Protein an der Plasmamembran registriert werden; interessanterweise galt dies auch für MaxiK α -wt, das nicht an der Zelloberfläche detektiert wurde (Daten nicht gezeigt). Unter permeabilisierenden Bedingungen konnten dagegen beide MaxiK Proteine nachgewiesen werden.

Ein entsprechender Versuch wurde auch an frisch isolierten Aortenzellen aus der Ratte durchgeführt. Eine Transfektion dieser Primärkulturen war nur bis Passage sechs möglich und betrug auch dann nur 5%. Die Ergebnisse ließen ebenfalls nicht auf eine Integration sowohl des Wildtyp als auch der Spleißvariante in die Plasmamembran schließen, obwohl beide Proteine exprimiert wurden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend gilt daher, dass in beiden Zellsystemen kein Transport von überexprimierten MaxiK- α -Proteinen (wie auch Wildtyp-Proteinen) an die Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte.

⁸ human umbilicus vein endothelial cells = humane Gefäßendothelzellen der Nabelschnur

4 Diskussion

4.1 Validierung des Testsystems CHO-Trex-MaxiK- α + β 1

Zur Identifizierung von Substanzen, die infolge einer spezifischen MaxiK-Aktivierung zu einer Vasorelaxation führen und damit therapeutisch zur Bekämpfung des Bluthochdrucks eingesetzt werden können, wurde in dieser Arbeit ein Testsystem etabliert und validiert, welches die nativen Verhältnisse widerspiegelt und darüber hinaus den Anforderungen der industriellen Hochdurchsatztechnologie („High-throughput screening“, (Substanz)-Durchmusterung im Hochdurchsatzverfahren) gerecht wird.

Seit Mitte der neunziger Jahre verfolgen die Pharma-Unternehmen bei der Identifizierung neuer Therapeutika die Strategie der generalisierten Wirkstoffsuche, nach der zunächst alle verfügbaren chemischen Verbindungen berücksichtigt werden, um Interaktionen mit der Zielstruktur zu identifizieren („target-based approach“). Da die Substanzbibliotheken der großen Pharma-Konzerne Verbindungen in der Größenordnung von 10^6 enthalten, kann dies nur in automatisierter und miniaturisierter Weise effizient durchgeführt werden.

Auf diese Weise werden zumeist eine Vielzahl von Verbindungen entdeckt, die im weiteren Verlauf der Wirkstoffentwicklung größtenteils wieder verworfen werden. Die besten Substanzen gelangen jedoch möglicherweise in die klinische Entwicklung. Die sorgfältige Etablierung und Validierung eines aussagekräftigen Testsystems (engl. Assay) ist daher das Fundament für die erfolgreiche Entwicklung neuer Therapeutika.

Zur Rekonstruktion des vaskulären MaxiK Kanals in einem Assay-tauglichen Zellsystem wurde zunächst eine konstitutive Expression von MaxiK- α und - β 1 in CHO- und HEK293-Zellen eingesetzt. Ionenkanal-Assays für die Hochdurchsatz-Technologie sind bislang immer noch an die Verwendung von kultivierten Zellen geknüpft, da die lipophilen Kanalproteine in wässriger Lösung keinen funktionellen Verband bilden. Auch die Verwendung zellfreier Membransysteme ist technologisch noch nicht ausgereift. Jedoch birgt auch die Verwendung von Zellen als Testsystem Nachteile, die eine Assayetablierung erschweren. So stellt die Zelle ein hochkomplexes Reaktionsmedium dar, indem viele Faktoren störend wirken können. Hinzu kommt, dass bei der Verwendung von lebenden Systemen ein erhöhter Aufwand bezüglich der Kultivierung und Vermehrung geleistet und der zelluläre Geno- bzw. Phänotyp ständig kontrolliert werden muss.

Experimente mit den stabil transfizierten CHO- und HEK293-Zellen zeigten, dass diese Zellen in Kultur degenerierten und nur noch geringe MaxiK-Ströme aufwiesen. Offensichtlich ist die

Überexpression des Kanals in diesen Zellen toxisch; der Grund dürfte in der drastischen Erhöhung der Kalium-Leitfähigkeit liegen.

Durch die Verwendung eines Tetrazyklin-induzierbaren Promotors konnte dieses Problem effektiv umgangen werden. MaxiK- α und $-\beta 1$, über eine IRES-Sequenz miteinander verbunden, wurden zusammen mit dem induzierbaren Promotor in genetisch veränderte CHO- bzw. HEK293-Zellen transfiziert, die den Tetrazyklin-Repressor TetR exprimierten. Durch Zugabe von Tetra-/Doxyzyclin konnte so die Expression des Kanalkomplexes initiiert werden. Die elektrophysiologische Validierung der transfizierten CHO- und HEK293-Zellen wies nach, dass auch nicht-induzierte Zellen eine geringe MaxiK-Expression aufwiesen. Offenbar war daher die Repression des Promotors nicht zu 100% gegeben; das niedrige Expressionsniveau führte aber nicht zu Komplikationen in der Zellkultivierung oder Stabilität des Transgens.

Nach Induktion des vaskulären MaxiK Kanals in den genetisch veränderten CHO-Zellen erhöhte sich die Kaliumstromdichte um das 20fache (bei +80mV) im Vergleich zur Parentalzelllinie. Die Ströme ließen sich durch Zugabe des spezifischen Inhibitors Paxillin um 98% reduzieren. Dies steht in Einklang mit Literaturdaten, nach denen 1 μ M des Indolalkaloids den MaxiK Kanal vollständig hemmen (Knaus *et al.*, 1994c). Die Strom-Spannungs-Kennlinien der CHO-Trex-MaxiK- α + $\beta 1$ -Zellen beschrieb die Anwesenheit eines spannungs-abhängigen Kaliumkanals. Im Gegensatz dazu wiesen die endogenen Kanalpopulationen Stromantwortkurven einwärts rektifizierender Kaliumkanäle auf, ohne dass ein nennenswerter Beitrag eines endogenen spannungs-aktivierten Kaliumkanals detektiert werden konnte.

Auch die Ca²⁺-Abhängigkeit des MaxiK Kanals konnte eindeutig nachgewiesen werden. Ein Wechsel von 100nM zu 100 μ M Kalzium in der Badlösung führte in der inside-out-Konfiguration zu einer Linksverschiebung der Strom-Spannungs-Kennlinie und damit zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Demzufolge ändert sich $V_{1/2}$, das Potential, bei dem 50% des Maximalstroms gemessen wird, von 102 auf -5mV. Dagegen wurden von anderen Arbeitsgruppen bei Verwendung von < 1 μ M Ca²⁺ in der intrazellulären Lösung $V_{1/2}$ von 40mV (inside-out-Ableitungen in der Oozyte (McManus *et al.*, 1995)), 190mV (Oozyten Makro-Patch (Valverde *et al.*, 1999)) aber auch 102mV (inside-out-Ableitungen in der Oozyte (Brenner *et al.*, 2000)) und 100mV (excised patch an HEK293-Zellen (Lippiat *et al.*, 2003)) gemessen. Die Diskrepanz mit der vorliegenden Arbeit wird erst bei Ca²⁺-Konzentrationen von 100 μ M deutlich, wo die Daten der zitierten Literaturstellen durchweg negativere $V_{1/2}$ ermittelten, so z.B. -150mV (McManus *et al.*, 1995), -100mV (Valverde *et al.*, 1999) oder -50mV (Lippiat *et al.*, 2003; Brenner *et al.*, 2000). Es ist deswegen darauf hinzuweisen, dass in der vorliegenden Arbeit nicht unter symmetrischen sondern phy-

siologischen K^+ -Bedingungen gemessen wurde, daher könnte die Verkleinerung von $\Delta V_{1/2}$ in diesem Fall darauf beruhen, dass die generierten Auswärtsströme bereits früher in einen Sättigungszustand eingehen.

Die funktionelle Interaktion zwischen α - und β_1 -Protein wurde des weiteren pharmakologisch durch die Verwendung von Dehydrosoyasaponin-I bestätigt. Dieses Terpen-Glykosid aus *Desmodium adscendes* aktiviert selektiv $\alpha\beta_1$ -MaxiK Kanäle von der intrazellulären Seite aus (McManus *et al.*, 1993), aber nicht MaxiK- α alleine. Die Zugabe von $1\mu\text{M}$ DHS-I in der inside-out-Konfiguration führte zu einer Vervierfachung der Stromamplitude, sodass in Übereinstimmung mit der Literatur (McManus *et al.*, 1995) von einer funktionellen Interaktion der beiden Kanaluntereinheiten ausgegangen werden kann.

Dieses funktionelle Zusammenspiel der beiden Kanaluntereinheiten im MaxiK Kanal ist für das zu entwickelnde Testsystem von essentieller Bedeutung. Durch Expression beider MaxiK-Untereinheiten wird es möglich sein nicht nur Substanzen zu identifizieren, die die Aktivität der porenbildenden α -Untereinheit direkt beeinflussen, sondern auch solche, die über die β_1 -Untereinheit wirken. Durch die restriktierte Expression der MaxiK- β_1 zeichnet sich letzterer Ansatz durch eine hohe Spezifität für vaskuläre Gewebe aus (Tanaka *et al.*, 1997).

Auf der Grundlage dieser Arbeiten wurde ein CHO-MaxiK- $\alpha+\beta_1$ Zellklon für den Aufbau eines HTS-fähigen Assays ausgewählt. Darüber hinaus wurde der Wirkmechanismus einer extrazellulären pH-Wert-Absenkung geklärt, der sich bei der Entwicklung des Assays als vorteilhaft erwiesen hatte. Der in der Aventis Herz-Kreislaufabteilung entwickelte MaxiK-Assay beruht auf der Messung des Membranpotentials durch einen Potential-abhängigen Farbstoff. Da das Membranpotential von den relativen Permeabilitäten aller in einer Zelle exprimierten Ionenkanälespezies abhängt, wird von der Spezies mit der grössten relativen Leitfähigkeit der grösster Anteil an Membranpotentialänderungen getragen. Ansäuerung des extrazellulären Milieus inhibierte MaxiK-Ströme (Abb.11), gleichzeitig aber auch endogene K^+ -Leitfähigkeiten, sodass sich insgesamt der relative Beitrag von MaxiK Kanälen am Membranpotential erhöhte. Diese Tatsache wird in dem Membranpotentialassay, der bei einem extrazellulären pH von 5,5 durchgeführt wird, ausgenutzt, um ein gutes MaxiK-spezifisches Signal-Rauschverhältnis zu realisieren.

4.2 Aktivatoren des MaxiK Kanals

Zusammen mit dem *Xenopus laevis* Oozyten-System stand mit CHO-TRex-MaxiK- α + β 1-Zellen nun ein geeignetes *in vitro*-Modell zur Verfügung, um die Wirkungsweise publizierter Aktivatoren des MaxiK Kanals zu analysieren. Im Laufe dieser Untersuchungen konnten die Anforderungen an zu identifizierende Substanzen präzisiert werden; dabei zeigte sich, dass der Bedarf nach neuen aktivierenden Substanzen durch die Unzulänglichkeiten der bekannten Verbindungen bestimmt wird.

Bei der Analyse bekannter MaxiK-Aktivatoren wurde zunächst das Expressionssystem *Xenopus laevis*-Oozyten verwendet. Dabei zeigte sich, dass die Ergebnisse qualitativ und quantitativ nur schlecht reproduzierbar waren, was sich mit der unzureichenden Kontrolle des intrazellulären Kalziumspiegels erklären lässt. Aus demselben Grund wurde bei der Analyse an Säugerzellen auf die cell-attached-Konfiguration verzichtet und ausschliesslich in der excised-patch oder whole-cell Konfiguration gearbeitet, die eine Kontrolle der intrazellulären Kalziumkonzentration erlauben. Dies steht im Einklang mit den Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen (Gribkoff *et al.*, 2001a).

Die gezielte Suche nach MaxiK-Aktivatoren führte zur Identifizierung der Pionierverbindungen NS1619 und NS004 durch Olesen *et al.* (Olesen *et al.*, 1994a; Olesen *et al.*, 1994b), welche bis heute als Referenzstrukturen bei der Entwicklung neuer Substanzen angesehen werden können. Das chemische Grundgerüst besteht aus einem CF₃-substituierten Benzimidazolone, welches an einem Stickstoffatom mit einem Phenylrest mit -I-Substituenten verbunden ist (siehe Abb.12). NS1619 und die verwandten Strukturen NS004 und N1608 öffnen heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimierte MaxiK- α -Homomere (Dworetzky *et al.*, 1996) mit einem EC₅₀ um 2 μ M und aktivieren native MaxiK Kanäle in Primärkulturen zerebellärer Körnerzellen (Olesen *et al.*, 1994a) und kortikalen Neuronen (Lee *et al.*, 1995a; Lee *et al.*, 1995b). Der Mechanismus beruht auf einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit des Kanals zu negativeren Potentialen (Siemer *et al.*, 2000). Die präklinische Entwicklung der Substanzen zur Behandlung zerebraler Ischämie und Psychosen wurde jedoch aufgrund unzureichender Wirkung vorerst eingestellt. Neben der MaxiK-Aktivierung wurde in einigen Zelltypen (z. B. Glattmuskelzellen) auch eine Inhibition von L-Typ-Kalziumkanälen und spannungsgesteuerten Kaliumkanäle ermittelt (Edwards *et al.*, 1994). In Koronararterien des Schweins wurde darüber hinaus eine Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern nach Substanzapplikation bemerkt (Yamamura *et al.*, 2001), was in internen Ionophor-Analysen bestätigt werden konnte (Abb.39).

In dieser Arbeit wurde NS1619 für die Validierung der TEVC-Technik an *Xenopus* Oozyten eingesetzt. 10 μ M der Substanz verursachten Stromamplitudenzunahmen in Zellen mit hete-

rolog exprimierter MaxiK- α bzw. MaxiK- α + β_1 . Aufgrund einer schlechten Reproduzierbarkeit und da in der Zwischenzeit die potentere Substanz CGS7181 zur Verfügung stand, wurde die Verbindung nicht weiter verwendet.

Die Weiterentwicklung der Neurosearch-Strukturen führte zur Identifizierung von CGS7181 und seinen Derivaten durch Ciba-Geigy. In diesen Verbindungen ist der Benzimidazol-Ring formal zu einem Indol geöffnet worden (Calderone, 2002), welches über eine Harnstoffbrücke mit einem Arylrest verbunden ist (siehe Abb.12). Die Aktivierung von MaxiK Kanälen wurde in der Ganzzell- und in der inside-out-Konfiguration an isolierten Glattmuskelzellen aus Schweineaorten und Blasensphinktern bestätigt (Hu *et al.*, 1997).

In der Ganzzell-Konfiguration verursachte die Gabe von 10 μ M CGS7181 in die extrazelluläre Badlösung bei CHO-TREx-MaxiK- α + β_1 eine Erhöhung der MaxiK-vermittelten Stromamplitude um das 3,9fache (gemessen bei +80 mV). Der stimulierende Effekt trat dabei erst oberhalb +35 mV auf, was in Einklang mit den in der Literatur publizierten Daten steht (Hu *et al.*, 1997).

Um zu überprüfen, ob CGS7181 entsprechend NS1619 als Ca²⁺-Ionophor wirkt, wurde mit Hilfe des Kalzium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2-AM der intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel im Imaging-Verfahren während der Zugabe von 10 μ M CGS7181 beobachtet. Dabei wurde eine Fluoreszenzzunahme registriert, die bei der Verwendung von EGTA in der Badlösung abgeschwächt verblieb. Auch nach Vorbehandlung der Zellen mit Thapsigargin und ATP, um die Kalzium-Speicher des intrazellulären Retikulums zu entleeren, und in Anwesenheit von EGTA wurden noch Ca²⁺-Transienten ermittelt. In einer groben Abschätzung kann davon ausgegangen werden, dass etwa 20% des Kations aus intrazellulären Kompartimenten freigesetzt wird. Ähnlich NS1619 wirkt daher auch CGS7181 neben der MaxiK-Aktivierung als Ca²⁺-Ionophor.

In einem über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehenden Vergleich der Ionophoreigenschaften verschiedener MaxiK-Aktivatoren wurde ermittelt, dass CGS7181 eine etwa doppelt so grossen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels wie NS1619 auslöst (siehe Abb.39). Darüber hinaus zeigten Sanofi-Aventis-interne Experimente, dass CGS7181 zur Depletion zellulären ATPs führt (T. Licher, unveröffentlicht).

Diese negativen Nebenwirkungen von CGS7181 könnten die Grundlage für die Tatsache sein, dass die Entwicklung von CGS7181 in der präklinischen Phase abgebrochen wurde.

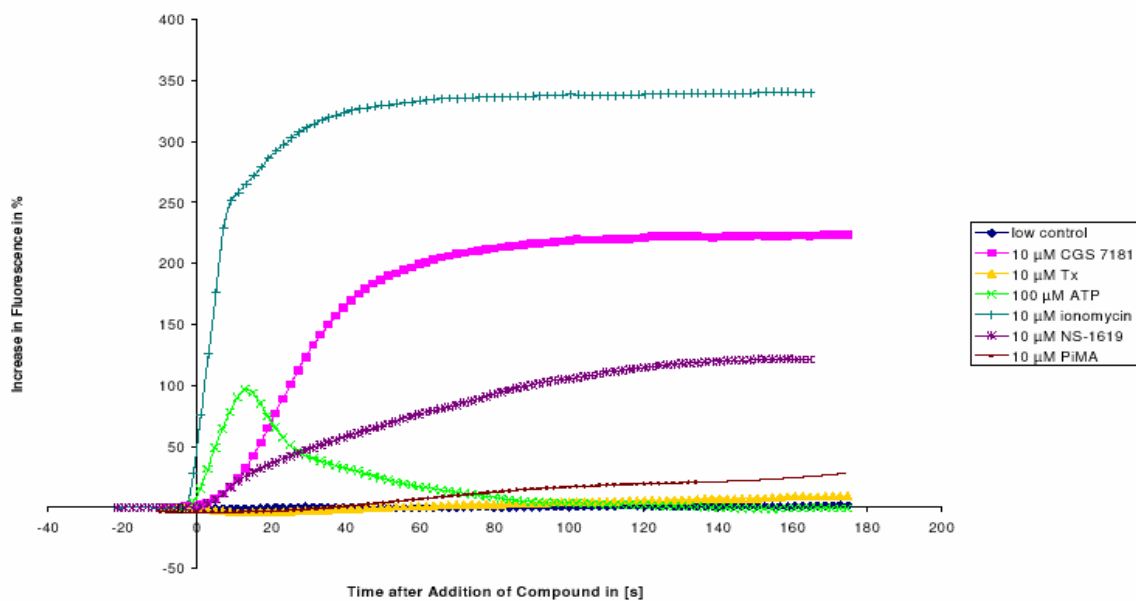


Abb. 39: Vergleich der Ionophor-Eigenschaften von MaxiK-Aktivatoren in CHO-Trex-MaxiK- α + β 1-Zellen (Mit freundlicher Genehmigung von S. Böhn). Vergleich der Ionophor-Eigenschaften verschiedener MaxiK-Aktivatoren mittels des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-4-AM. Dargestellt ist die Fluoreszenzzunahme nach Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration als Antwort auf die Zugabe der Aktivatoren in Abhängigkeit von der Zeit. Als Negativkontrolle („low control“) diente DMSO. Abkürzungen: PiMa, Pimarinsäure; Tx, Tamoxifen

Naturstoffe bieten eine schwerer zugängliche Quelle für die Identifizierung neuer MaxiK Kanal-Aktivatoren (Nardi *et al.*, 2003). Modulatoren aus dieser Klasse zeichnen sich durch ihre diversen Strukturen, die zumeist an die Existenz von Stereozentren geknüpft ist, was die Synthese erschwert, und ihre heterogenen Wirkungsweisen aus.

Im Unterschied zu den bisher besprochenen Verbindungen wirken Steroide wie Estrogen (Valverde *et al.*, 1999) und Tamoxifen (Dick *et al.*, 2001) über die β_1 -Untereinheit des MaxiK Kanals. In dieser Arbeit konnten die stimulatorischen Effekte von z.B. β -Estradiol in Oozyten jedoch nicht bestätigt werden. Darüber hinaus verursachte Tamoxifen auch im fluorometrischen Membranpotentialassay keine Aktivierung des MaxiK Kanals (Daten nicht gezeigt). Die Gründe für die Unwirksamkeit von Estrogenderivaten in unseren Experimenten sind bislang unklar. Allerdings konnten nichtgenomische Estrogen-Effekte auf den MaxiK Kanal auch in anderen Laboren nicht reproduziert werden (O. Pongs, pers. Mitteilung). Eine mangelnde Verfügbarkeit des β_1 -Proteins kann ausgeschlossen werden, da DHS-I, welches ebenfalls über die Hilfsuntereinheit wirkt (Giangiacomo *et al.*, 1998), eine starke und reproduzierbare Aktivierung aufwies. Dieses Terpenoid-Glykosid ist jedoch aufgrund seiner Größe nicht als Ausgangspunkt für die Synthese neuer Verbindungen geeignet; zudem wirkt es nur von der intrazellulären Seite und ist nicht membranpermeabel (McManus *et al.*, 1995).

Neben diesen $\alpha+\beta_1$ -spezifischen Aktivatoren existieren Naturstoffe, die nur auf die α -Untereinheit wirken. Eine vielversprechende Substanz ist das Dehydroabietinderivat Pimarinsäure (Abb.18). Dieses Terpenoid des Pinienharzes führte ab einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ zu einer Erhöhung der MaxiK-vermittelten Ströme in transfizierten HEK293-Zellen (Imaizumi *et al.*, 2002). Dabei spielte es keine Rolle, ob die Substanz intra- oder extrazellulär appliziert wurde.

In der vorliegenden Studie konnte die Wirkung von Pimarinsäure in der Ganzzellkonfiguration bestätigt werden. In CHO-TREx-MaxiK- $\alpha+\beta_1$ -Zellen führte die Zugabe von $10\mu\text{M}$ der Substanz zu einer (moderaten) MaxiK-Stimulation um einen Faktor von 2,45. Auch im Membranpotentialassay führte Pimarinsäure zu einer Erhöhung der Fluoreszenz um 108% (Daten nicht gezeigt). Demgegenüber konnte keine ausgeprägte Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration ermittelt werden (siehe Abb.39). Dieses Beispiel zeigt, dass es durchaus möglich ist, potente Aktivatoren zu identifizieren, deren Wirkungsweise nicht an eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration gekoppelt ist. Aufgrund der Unselektivität bezüglich der β_1 -Untereinheit ist die Pimarinsäurestruktur kein idealer Kandidat für die Entwicklung eines Blutdrucksenkers. Potentere bzw. selektivere Derivate dieser Substanz könnten allerdings interessante Ausgangspunkte sein, um die Effekte einer nebenwirkungsfreien MaxiK-Stimulation *in vivo* weiter zu studieren.

Der aktivierende Einfluß der cGMP-Signalkaskade auf die BK-Aktivität in stabil transfizierten Zelllinien oder Koronararterien ist schon seit einiger Zeit bekannt (Zhou *et al.*, 1998). Demzufolge wird auch ein Teil der therapeutischen Wirkung von Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase (z.B. bei Angina pectoris-Patienten) der BK-stimulierenden Wirkung in Form einer Vasodilatation und eines Blutdruckabfalls zugeschrieben. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente belegen darüber hinaus auch die Verwendung des Testsystems HEK293-BK- $\alpha+\beta_1$ für die Validierung potentieller Guanylatzyklase-Aktivatoren. Offensichtlich ist der dafür notwendige cGMP-Signalweg in HEK293 Zellen nutzbar, ohne dass durch Expression weiterer Hilfsproteine der Effekt verstärkt werden muss; die vorhandene Zellphysiologie ist ausreichend, was das Testsystem gegenüber vielen anderen artifiziellen Systemen vorteilhaft erscheinen lässt.

Im Unterschied dazu korrelierten die Daten, die für die Inhibitoren der Rho-Kinase erhalten wurden, nicht mit Referenzmessungen, die an isolierten Aortenringen erhalten wurden. In diesem Fall scheint die Interaktion von ROCK mit dem MaxiK Kanal im Testsystem CHO-TREx-MaxiK- $\alpha+\beta_1$ nicht nachweisbar.

4.3 Die Spleißvariante MaxiK- $\alpha\Delta S8$

Das MaxiK-Gen unterliegt einem ausgeprägten Spleißprozess, der gewebespezifisch kontrolliert wird (Iverson *et al.*, 1997). Für den humanen MaxiK Kanal wurden (ohne Berücksichtigung alternativer Exons am 5' und 3'-Ende der Sequenz) zumindest fünf Orte ermittelt, an denen Spleißinsertionen bzw. -deletionen gegenüber der publizierten Sequenz auftreten (Tseng-Crank *et al.*, 1994). Davon liegen vier im Carboxyterminus und eine in der Region zwischen den Domänen S1 und S2. Wie aus Abb.40 hervorgeht, stimmen die Positionen der carboxyterminalen Spleißstellen mit den Exon-Exon-Grenzen überein. In der in dieser Arbeit untersuchten $\alpha\Delta S8$ -Variante ist Exon 16 deletiert, welches der Spleißstelle 1 unmittelbar vorausgeht; gerade der Bereich zwischen S8 und S9 wird durch Spleißvorgänge intensiv reguliert.

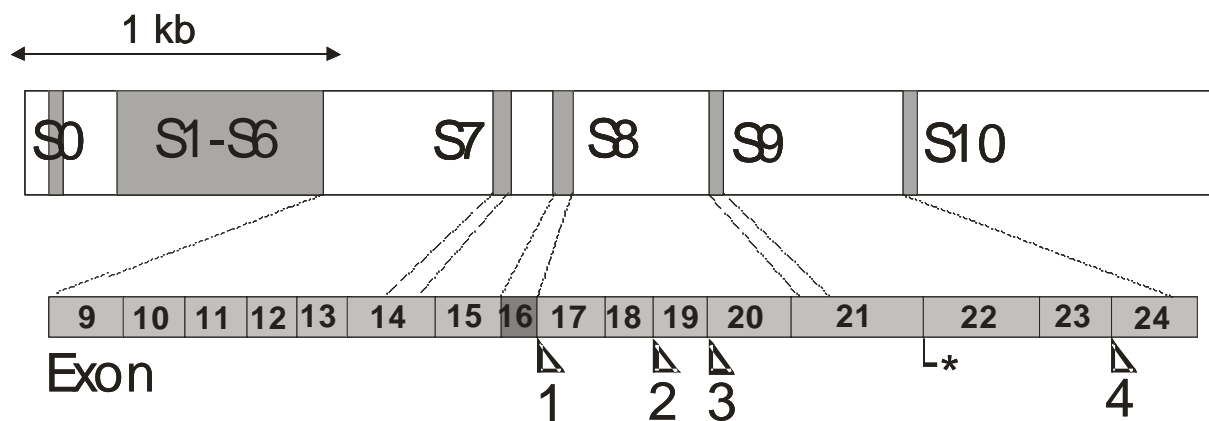


Abb. 40: Schematische Darstellung der Spleißisoformen im proximalen Carboxyterminus der humanen MaxiK- α -mRNS. In die Darstellung der mRNS sind die für die jeweiligen Proteindomänen kodierenden Bereiche hervorgehoben (Nomenklatur, siehe 1.4). Die Exon-kodierenden Sequenzen im humanen MaxiK-Gen KCNMA1 (Locus 10q22.3) wurden durch ENSEMBL (NIH, Bethesda, USA) bestimmt, deren Numerierung übernommen wurde. Exon 16, welches in $\alpha\Delta S8$ deletiert ist, ist dunkler dargestellt. Bekannte Spleißstellen sind durch Dreiecke gekennzeichnet, der Sequenzabbruch von rbslo2 aus dem Kaninchen durch einen Stern. Die Nummerierung der Spleißstellen startet ab Beginn des intrazellulären C-Terminus.

Zu den Funktionen des MaxiK Kanals, die durch das Spleißen beeinflusst werden, zählen die Kalzium- und Spannungsabhängigkeit (Lagrutta *et al.*, 1994) und die Regulation durch posttranslationale Modifikation (Tian *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001).

Daneben existieren auch Isoformen, die den intrazellulären Transport des Kanalproteins beeinflussen. So folgt in rbslo2 auf Exon 21 ein kurzer 15 aa-Rest (Abb. 40), bevor das Protein terminiert wird (Morita *et al.*, 1997). rbslo2 wird in HEK293- sowie in polarisierten mTAL-Zellen nicht an die Plasmamembran transportiert, so dass die Autoren mutmaßen, dass der eliminierte Bereich zum korrekten Transport notwendig ist (Wang *et al.*, 2003; Kwon & Guggino, 2004). Auch SV1, eine Spleißisoform, die eine 33 Aminosäuren-Insertion in der Region

zwischen S1 und S2 besitzt, wird im endoplasmatischen Retikulum von HEK293-Zellen zurückgehalten. Koexpression mit MaxiK- α bzw. β_1 führt zu einer Retention beider Untereinheiten durch SV1 im Sinne eines dominant-negativen Effektes (Zarei *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit MaxiK- $\alpha\Delta S8$ eine neue Isoform untersucht, die hauptsächlich im Gehirn, der Niere, der Plazenta und im Herzen exprimiert wird. Durch PCR-Analyse konnte die Expression der neuen Variante in den entsprechenden Geweben verifiziert werden. Aufgrund der geringen Qualität kommerziell erhältlicher Antikörper sowie der geringen Kanalexpressionsdichte, konnte eine zelluläre Lokalisation des nativen $\alpha\Delta S8$ -Proteins nicht erfolgreich durchgeführt werden, und ist eine Analyse per *in situ*-Hybridisierung stark erschwert.

Die Frage, ob die MaxiK- $\alpha\Delta S8$ -Variante funktionelle Kaliumkanäle bildet, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Nach Expression der Spleissvariante in HEK293-Zellen konnten signifikant höhere Kaliumströme als in Kontrollzellen, die mit lacZ transfiziert worden waren, gemessen werden; es war aber nicht möglich die Ströme biophysikalisch und pharmakologisch eindeutig als MaxiK-Ströme zu identifizieren. Versuche eine effizientere Expression der $\alpha\Delta S8$ durch Kotransfektion der β_1 -Untereinheit oder Nutzung des Oozytenmodells zu erreichen, scheiterten. Expression von MaxiK- β_1 mit oder ohne $\alpha\Delta S8$ führte zu einem Anstieg des Kaliumkanalstromes in HEK293 Zellen. Vermutlich interagiert die Hilfsuntereinheit mit endogenen Kanälen ohne MaxiK- $\alpha\Delta S8$ spezifisch zu beeinflussen. Ebenso konnten nach Injektion von *Xenopus laevis* Oozyten mit der Spleissvariante keine signifikanten Kaliumleitfähigkeiten detektiert werden.

In Immunfluoreszenzstudien wurde das $\alpha\Delta S8$ -Protein im Zellinneren überraschenderweise nicht an der Zellmembran nachgewiesen. Dies bedeutet, dass entweder keine Untereinheiten an die Plasmamembran gelangen oder ihre Zahl so gering ist, dass sie mit Immunfluoreszenztechniken nicht nachgewiesen werden können. Nichtsdestotrotz kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete geringfügige Stromerhöhung in $\alpha\Delta S8$ -transfizierten Zellen tatsächlich auf der Expression homomerer MaxiK- $\alpha\Delta S8$ Kanäle beruhte. Dass funktionelle MaxiK Kanäle trotz ineffizientem Transport zur Plasmamembran und/oder eingeschränkter Fähigkeit zur Assemblierung gebildet werden können, wurde z.B. von Piskorowski und Aldrich für eine C-terminal trunke Variante beschrieben (Piskorowski & Aldrich, 2002). Obwohl von den Autoren eindeutig auf Einzelkanalebene nachweisbar, konnte auch dieses Protein nicht mittels Immunfluoreszenz an der Zelloberfläche nachgewiesen werden und zeigte im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 1000 verringerte Stromamplituden.

Im Unterschied zur SV1 Variante (Zarei *et al.*, 2001) konnte kein dominant-negativer Effekt des $\alpha\Delta S8$ Proteins auf koexprimiertes MaxiK- α -wt bzw. MaxiK- β_1 detektiert werden. Demnach wäre davon auszugehen, dass die Interaktionsregionen auf der Isoform im Bereich der

S8-Domäne zu suchen sind. Andererseits bildet die $\alpha\Delta S8$ -Variante Homo-Tetramere, sodass zumindest die Assemblierung der Isoformproteine *per se* nicht gestört wird. In diesem Sinne ähnelt sie rbslo2, die ebenfalls autoassembliert, aber keine Heteromere bildet (Wang *et al.*, 2003; Kwon & Guggino, 2004). Während für die Koassemblierung mit der β -Untereinheit vor allem aminoterminalen Bereiche verantwortlich gemacht werden, lassen Literaturdaten einen Abschnitt im proximalen Carboxyterminus nahe der Pore als Tetramerisierungsregion von α -Proteinen vermuten (Quirk & Reinhart, 2001); beide Bereiche sind in rbslo2 und $\alpha\Delta S8$ vorhanden.

Ursache für die selektive Bildung von $\alpha\Delta S8$ -Homomerkomplexen könnte eine frühe räumliche Trennung der Proteinbiosynthese dieser Spleißvariante von anderen MaxiK- α -Varianten sein. Ebenso könnten Hilfsproteine, die selektiv zwischen Isoformen unterscheiden, durch Bindung oder andere Mechanismen eine Heteromerbildung verhindern. Spezifische akzessorische Proteine könnten darüber hinaus die Translokation zur Plasmamembran initiieren oder vermitteln, und ihre Abwesenheit würde die Retention der $\alpha\Delta S8$ -Variante im Expressionssystem erklären. Interaktionen dieser Art wurden für verschiedene Ionenkanäle beschrieben, z.B. Kir6.2 und SUR2B (Zerangue *et al.*, 1999). Bislang sind jedoch, abgesehen von dSLIP1 (Xia *et al.*, 1998) und Slob (Jaramillo *et al.*, 2004) in *Drosophila*, keine derartigen Interaktionspartner für den MaxiK Kanal identifiziert worden

Voraussetzung für eine Interaktion der S8-Domäne mit Hilfsproteinen während des Transportes zur Plasmamembran wäre eine Exposition der Domäne an der Proteinaußenfläche. Da die Kristallstruktur des Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanals MthK aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* bekannt ist (Jiang *et al.*, 2002b), lässt sich anhand von Homologiemodellen eine Abschätzung der Topologie des MaxiK Kanals im Bereich der S8-Domäne durchführen.

Ausgehend von einem Sequenzvergleich von MthK und MaxiK setzt sich der Carboxyterminus von letzterem aus zwei RCK-Domänen zusammen, die im funktionellen Kanaltetramer eine Oktameranordnung eingehen. Die RCK-Domänen bestehen aus α -Helix- und β -Faltblatt-Strukturen (siehe Abb.41), wobei ausgeprägt helikale Bereiche den Subdomänen S7-S10 zugrunde liegen. Die erste RCK-Domäne endet in Exon 18, also in einem Bereich mit gehäufte Spleißregulation. Offensichtlich ist hier im Übergang zwischen beiden RCK-Domänen eine günstige Region zur Modulation der Kanalfunktion, ohne sie zu reprimieren.

Exon 16, der Bereich der $\Delta S8$ -Deletion, ist analog zu den MthK-Substrukturen αH , αI und βH , wie ein Sequenzvergleich ergibt (Jiang *et al.*, 2002b). Diese α -helikalen und β -Faltblatt-Strukturen befinden sich in der Peripherie des Oktaeders, der durch die RCK-Domänen gebildet wird, und sollten für Protein-Protein Wechselwirkungen zugänglich sein. Diese Topolo-

gie stützt die Hypothese, dass die Domäne S8 eine Interaktionsfläche mit akzessorischen Proteinen darstellt.

Auf Basis der vorliegenden Ergebnisse kann über die physiologische Bedeutung der neuen MaxiK- $\alpha\Delta$ S8 Variante nur spekuliert werden. Die ineffiziente funktionelle Expression der Untereinheit in HEK 293 Zellen könnte auf eine Zelltyp-spezifische Regulation durch noch unbekannte Hilfsproteine hindeuten. Für eine abschließende Bewertung der Rolle dieser Spleißvariante wird es wichtig sein die Zelltypen zu identifizieren, welche MaxiK- $\alpha\Delta$ S8 nativ exprimieren und die Eigenschaften Ca^{2+} -aktivierter Kaliumströme in diesen Zellen genauer zu studieren.

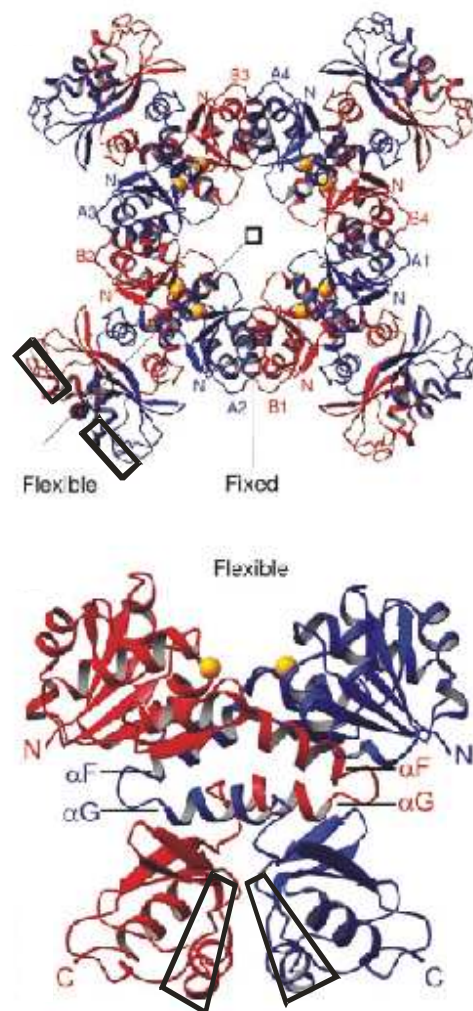


Abb. 41: Schematische Darstellung der RCK-Domänen im MthK-Kanal (Jiang *et al.*, 2002b).

Oben: Ansicht von unten entlang der vierfachen Symmetrieachse. Zur unteren Ansicht gelangt man durch Drehung von 90° um die flexible Achse. Unten: Seitenansicht eines RCK-Dimers. Die verschiedenen Domänen sind blau und rot gekennzeichnet. Die Lage putativ analoger Strukturen von Exon 16 ist eingerahmt, wobei im MaxiK Kanal nur eine der beiden möglichen Positionen durch die S8-Domäne eingenommen wird.

5 Zusammenfassung

Ca²⁺-aktivierte Kaliumkanäle mit großer Leitfähigkeit (MaxiK oder BK Kanäle) sind als Schlüsselemente an der Regulation der elektrischen Aktivität vieler erregbarer Zellen beteiligt. Die duale Steuerung dieser Kanäle durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration und das Membranpotential macht MaxiK Kanäle zu effektiven Integratoren multipler zellulärer Signalprozesse.

Der MaxiK Kanal der glatten Gefäßmuskulatur ist entscheidend an der Repolarisierung von glatten Muskelzellen und der Terminierung des Kalziumeinstromes während der Vasokonstriktion beteiligt. Zahlreiche Arbeiten, u.a. an β_1 -Knock-out Mäusen (Brenner *et al.*, 2000b) und humanen genetischen Variationen des β_1 -Gens (Amberg & Santana, 2003) belegen die wichtige Rolle des MaxiK Kanals für die Kontrolle des systemischen Blutdruckes in Säugern, einschließlich des Menschen (Nelson & Bonev, 2004; Amberg *et al.*, 2003). Aktivierung des vaskulären MaxiK Kanals könnte somit ein neues therapeutisches Prinzip zur Behandlung des Bluthochdrucks und seiner Folgeerkrankungen darstellen. Als pharmakologische Zielstruktur besonders interessant wird der vaskuläre MaxiK Kanal durch seine gewebespezifische Zusammensetzung aus α - und β_1 -Untereinheit und die Möglichkeit diese Kombination selektiv zu aktivieren (Tanaka *et al.*, 1997; McManus *et al.*, 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein induzierbares Zellmodell charakterisiert, welches die MaxiK α und β_1 Untereinheiten bicistronisch unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-sensitiven Promotors exprimiert. Die Untersuchungen ergaben, dass in diesem System funktionelle MaxiK Kanäle, die sich äquivalent zu nativen vaskulären MaxiK Kanälen verhielten, detektiert werden konnten. Im Vergleich zu anderen heterologen Expressionsmodellen zeichneten sich die induzierbaren Zelllinien durch eine große Stabilität und Reproduzierbarkeit der MaxiK Expression aus. Beide Eigenschaften sind wichtige Voraussetzungen für den Einsatz dieser Zelllinien im Hochdurchsatz-Screening zur Identifizierung neuer MaxiK Aktivatoren.

Die Nutzbarkeit dieses Testsystems zur Identifizierung von solchen Verbindungen wurde weiterhin durch die Untersuchung bekannter und neuer aktivierender Substanzen bestätigt. Dabei zeigte sich, dass insbesondere das Benzimidazolone CGS7181 sowie das Dehydroabietinderivat Pimarinsäure den Kanal potent aktivierten. Durch fluorimetrische Kalziummessungen konnte nachgewiesen werden, dass CGS7181 neben MaxiK-aktivierenden Eigenschaften auch einen potenten Ionophor für Ca²⁺ darstellt und damit wahrscheinlich keinen vielversprechenden Ausgangspunkt für die Entwicklung eines neuen Antihypertensivums darstellt.

Unter Benutzung der CHO-Trex-MaxiK- α + β_1 -Zelllinie wurden inzwischen in der Screening-Abteilung von Sanofi-Aventis im Hochdurchsatzverfahren über 700 Strukturen mit aktivierender Wirkung auf den MaxiK Kanal identifiziert. Mit diesem Ergebnis ist eine solide Grundlage

geschaffen, um im weiteren Verlauf des Projektes die Suche nach neuen blutdrucksenkenden Molekülen erfolgreich voranzutreiben.

Zur weiteren molekularen Validierung der Zielstruktur MaxiK wurde eine bisher nicht beschriebene Spleißvariante, $\alpha\Delta S8$, die auch in kardiovaskulären Geweben exprimiert ist, untersucht. Die transiente Expression in HEK293-Zellen führte zu signifikanten, aber im Vergleich zum MaxiK- α -wt geringen Kaliumströmen. Immunfluoreszenz-Experimente zeigten eine Retention des Proteins im Zellinneren, ohne dass eine Translokation in die Plasmamembran oder in distinkte Kompartimente gezeigt werden konnte. Dies galt auch für die Expression in primären Glattmuskelzellen und der Endothelzelllinie EAhy926. Eine Beteiligung der S8-Domäne an der Assemblierung der neuen Spleißvariante konnte durch den biochemischen Nachweis von $\alpha\Delta S8$ -Homomultimeren ausgeschlossen werden. Überraschenderweise wurde jedoch keine Interaktion von MaxiK- $\alpha\Delta S8$ und der Wildtyp- α -Untereinheit beobachtet. Man kann daher vermuten, dass die S8-Domäne eine Rolle beim Kanaltransport spielt und möglicherweise in distinkten Zelltypen eine Wechselwirkungsfläche für bislang unbekannte Interaktionspartner bildet.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. Adelman JP, Shen KZ, Kavanaugh MP, Warren RA, Wu YN, Lagrutta A, Bond CT, & North RA (1992). Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron* **9**, 209-216.
2. Alioua A, Huggins JP, & Rousseau E (1995). PKG-I alpha phosphorylates the alpha-subunit and upregulates reconstituted GKCa channels from tracheal smooth muscle. *Am J Physiol* **268**, L1057-L1063.
3. Amberg GC, Bonev AD, Rossow CF, Nelson MT, & Santana LF (2003). Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca(2+) activated K(+) channels in vascular smooth muscle during hypertension. *J Clin Invest* **112**, 717-724.
4. Amberg GC & Santana LF (2003). Downregulation of the BK channel beta1 subunit in genetic hypertension. *Circ Res* **93**, 965-971.
5. Andersen HK, Urbach V, Van Kerkhove E, Prosser E, & Harvey BJ (1995). Maxi K+ channels in the basolateral membrane of the exocrine frog skin gland regulated by intracellular calcium and pH. *Pflugers Arch* **431**, 52-65.
6. Atkinson NS, Robertson GA, & Ganetzky B (1991). A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus. *Science* **253**, 551-555.
7. Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, Kislinger T, Stern DM, Schmidt AM, & De Caterina R (2002). Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation* **105**, 816-822.
8. Berridge MJ, Lipp P, & Bootman MD (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 11-21.
9. Bezanilla F, Taylor RE, & Fernandez JM (1982). Distribution and kinetics of membrane dielectric polarization. 1. Long-term inactivation of gating currents. *J Gen Physiol* **79**, 21-40.
10. Bian S, Favre I, & Moczydlowski E (2001). Ca2+-binding activity of a COOH-terminal fragment of the *Drosophila* BK channel involved in Ca2+-dependent activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4776-4781.
11. Bonev AD, Jaggar JH, Rubart M, & Nelson MT (1997). Activators of protein kinase C decrease Ca2+ spark frequency in smooth muscle cells from cerebral arteries. *Am J Physiol* **273**, C2090-C2095.

12. Brelidze TI, Niu X, & Magleby KL (2003). A ring of eight conserved negatively charged amino acids doubles the conductance of BK channels and prevents inward rectification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9017-9022.
13. Brenner R, Jegla TJ, Wickenden A, Liu Y, & Aldrich RW (2000a). Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J Biol Chem* **275**, 6453-6461.
14. Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, & Aldrich RW (2000b). Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* **407**, 870-876.
15. Butler A, Tsunoda S, McCobb DP, Wei A, & Salkoff L (1993). mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* **261**, 221-224.
16. Calderone V (2002). Large-conductance, ca(2+)-activated k(+) channels: function, pharmacology and drugs. *Curr Med Chem* **9**, 1385-1395.
17. Candia S, Garcia ML, & Latorre R (1992). Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca(2+)-activated K+ channel. *Biophys J* **63**, 583-590.
18. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, & Weiner CP (2000). Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* **184**, 409-420.
19. Chitale K & Webb RC (2002). Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of rho-kinase signaling. *Hypertension* **39**, 438-442.
20. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., & Roccella EJ (2003). The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* **289**, 2560-2572.
21. Church J, Baxter KA, & McLarnon JG (1998). pH modulation of Ca²⁺ responses and a Ca²⁺-dependent K⁺ channel in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol* **511 (Pt 1)**, 119-132.
22. Cox RH (2002). Changes in the expression and function of arterial potassium channels during hypertension. *Vascul Pharmacol* **38**, 13-23.
23. Dick GM, Rossow CF, Smirnov S, Horowitz B, & Sanders KM (2001). Tamoxifen activates smooth muscle BK channels through the regulatory beta 1 subunit. *J Biol Chem* **276**, 34594-34599.

24. Dick GM & Sanders KM (2001). (Xeno)estrogen sensitivity of smooth muscle BK channels conferred by the regulatory beta1 subunit: a study of beta1 knockout mice. *J Biol Chem* **276**, 44835-44840.
25. Dworetzky SI, Boissard CG, Lum-Ragan JT, McKay MC, Post-Munson DJ, Trojnacki JT, Chang CP, & Gribkoff VK (1996). Phenotypic alteration of a human BK (hSlo) channel by hSlobeta subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation. *J Neurosci* **16**, 4543-4550.
26. Dworetzky SI, Trojnacki JT, & Gribkoff VK (1994). Cloning and expression of a human large-conductance calcium-activated potassium channel. *Brain Res Mol Brain Res* **27**, 189-193.
27. Edgell CJ, McDonald CC, & Graham JB (1983). Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3734-3737.
28. Edwards G, Niederste-Hollenberg A, Schneider J, Noack T, & Weston AH (1994). Ion channel modulation by NS 1619, the putative BKCa channel opener, in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* **113**, 1538-1547.
29. England SK, Wooldridge TA, Stekiel WJ, & Rusch NJ (1993). Enhanced single-channel K⁺ current in arterial membranes from genetically hypertensive rats. *Am J Physiol* **264**, H1337-H1345.
30. Fettiplace R & Fuchs PA (1999). Mechanisms of hair cell tuning. *Annu Rev Physiol* **61**, 809-834.
31. Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, & Coffey RG (1993). Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol* **265**, H774-H778.
32. Fu X, Gong MC, Jia T, Somlyo AV, & Somlyo AP (1998). The effects of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 on arachidonic acid-, GTPgammaS-, and phorbol ester-induced Ca²⁺-sensitization of smooth muscle. *FEBS Lett* **440**, 183-187.
33. Fukata Y, Amano M, & Kaibuchi K (2001). Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 32-39.
34. Gardos G (1958). Effect of ethylenediaminetetraacetate on the permeability of human erythrocytes. *Acta Physiol Hung* **14**, 1-5.
35. Giangiacomo KM, Fremont V, Mullmann TJ, Hanner M, Cox RH, & Garcia ML (2000). Interaction of charybdotoxin S10A with single maxi-K channels: kinetics of blockade depend on the presence of the beta 1 subunit. *Biochemistry* **39**, 6115-6122.

36. Giangiaco­mo KM, Kamassah A, Harris G, & McManus OB (1998). Mechanism of maxi-K channel activation by dehydrosoyasaponin-I. *J Gen Physiol* **112**, 485-501.
37. Gollasch M, Lohn M, Furstenau M, Nelson MT, Luft FC, & Haller H (2000). Ca²⁺ channels, Ca²⁺ sparks, and regulation of arterial smooth muscle function. *Z Kardiol* **89 Suppl 2**, 15-19.
38. Gragasin FS, Michelakis ED, Hogan A, Moudgil R, Hashimoto K, Wu X, Bonnet S, Haromy A, & Archer SL (2004). The neurovascular mechanism of clitoral erection: nitric oxide and cGMP-stimulated activation of BKCa channels. *FASEB J* **18**, 1382-1391.
39. Gribkoff VK, Starrett JE, Jr., & Dworetzky SI (2001a). Maxi-K potassium channels: form, function, and modulation of a class of endogenous regulators of intracellular calcium. *Neuroscientist* **7**, 166-177.
40. Gribkoff VK, Starrett JE, Jr., Dworetzky SI, Hewawasam P, Boissard CG, Cook DA, Frantz SW, Heman K, Hibbard JR, Huston K, Johnson G, Krishnan BS, Kinney GG, Lombardo LA, Meanwell NA, Molinoff PB, Myers RA, Moon SL, Ortiz A, Pajor L, Pieschl RL, Post-Munson DJ, Signor LJ, Srinivas N, Taber MT, Thalody G, Trojnacki JT, Wiener H, Yeleswaram K, & Yeola SW (2001b). Targeting acute ischemic stroke with a calcium-sensitive opener of maxi-K potassium channels. *Nat Med* **7**, 471-477.
41. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, & Sigworth FJ (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85-100.
42. Hardman JG, Limbird LE, & Goodman Gilman A (2001). Goodman&Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. New York, McGraw-Hill.
43. Harnett KM & Biancani P (2003). Calcium-dependent and calcium-independent contractions in smooth muscles. *Am J Med* **115 Suppl 3A**, 24S-30S.
44. Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, & MacKinnon R (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J* **66**, 1061-1067.
45. Hermann A & Hartung K (1983). Ca²⁺ activated K⁺ conductance in molluscan neurons. *Cell Calcium* **4**, 387-405.
46. Herrera GM & Nelson MT (2002). Sarcoplasmic reticulum and membrane currents in: Role of the sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. Novartis Foundation Symposium 246, John Wiley & Sons, Ltd, London.
47. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, & Pease LR (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.

48. Hodgkin AL, Huxley AF, & Katz B (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* **116**, 424-448.
49. Hodgkin AL & Katz B (1949). The effect of calcium on the axoplasm of giant nerve fibers. *J Exp Biol* **26**, 292-4, pl.
50. Hu E & Lee D (2003). Rho kinase inhibitors as potential therapeutic agents for cardiovascular diseases. *Curr Opin Investig Drugs* **4**, 1065-1075.
51. Hu S., Fink, C. A., Kim, H. S., and Lappe, R. W (1997). Novel and potent BK channel openers: CGS7181 and its analogs. *Drug Development Research* **41**, 10-21.
52. Ikemoto N & Yamamoto T (2000). Postulated role of inter-domain interaction within the ryanodine receptor in Ca(2+) channel regulation. *Trends Cardiovasc Med* **10**, 310-316.
53. Imaizumi Y, Sakamoto K, Yamada A, Hotta A, Ohya S, Muraki K, Uchiyama M, & Ohwada T (2002). Molecular basis of pimarane compounds as novel activators of large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel alpha-subunit. *Mol Pharmacol* **62**, 836-846.
54. Ishii TM, Maylie J, & Adelman JP (1997a). Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. *J Biol Chem* **272**, 23195-23200.
55. Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, & Maylie J (1997b). A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11651-11656.
56. Iverson LE, Mottes JR, Yeager SA, & Germeraad SE (1997). Tissue-specific alternative splicing of Shaker potassium channel transcripts results from distinct modes of regulating 3' splice choice. *J Neurobiol* **32**, 457-468.
57. Jackson WF (2000). Ion channels and vascular tone. *Hypertension* **35**, 173-178.
58. Jaggar JH, Leffler CW, Cheranov SY, Tcheranova D, E S, & Cheng X (2002). Carbon monoxide dilates cerebral arterioles by enhancing the coupling of Ca²⁺ sparks to Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ Res* **91**, 610-617.
59. Jaggar JH, Porter VA, Lederer WJ, & Nelson MT (2000). Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C235-C256.
60. Jaramillo AM, Zheng X, Zhou Y, Amado DA, Sheldon A, Sehgal A, & Levitan IB (2004). Pattern of distribution and cycling of SLOB, Slowpoke channel binding protein, in *Drosophila*. *BMC Neurosci* **5**, 3.

61. Jensen BS, Strobaek D, Olesen SP, & Christophersen P (2001). The Ca²⁺-activated K⁺ channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments? *Curr Drug Targets* **2**, 401-422.
62. Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, & MacKinnon R (2002b). Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* **417**, 515-522.
63. Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, & MacKinnon R (2002a). The open pore conformation of potassium channels. *Nature* **417**, 523-526.
64. Jiang Y, Pico A, Cadene M, Chait BT, & MacKinnon R (2001). Structure of the RCK domain from the E. coli K⁺ channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron* **29**, 593-601.
65. Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, & MacKinnon R (2003). The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**, 42-48.
66. Jiang Z, Wallner M, Meera P, & Toro L (1999). Human and rodent MaxiK channel beta-subunit genes: cloning and characterization. *Genomics* **55**, 57-67.
67. Kaczorowski GJ & Garcia ML (1999). Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Chem Biol* **3**, 448-458.
68. Kaczorowski GJ, Knaus HG, Leonard RJ, McManus OB, & Garcia ML (1996). High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. *J Bioenerg Biomembr* **28**, 255-267.
69. Knaus HG, Eberhart A, Glossmann H, Munujos P, Kaczorowski GJ, & Garcia ML (1994a). Pharmacology and structure of high conductance calcium-activated potassium channels. *Cell Signal* **6**, 861-870.
70. Knaus HG, Garcia-Calvo M, Kaczorowski GJ, & Garcia ML (1994b). Subunit composition of the high conductance calcium-activated potassium channel from smooth muscle, a representative of the mSlo and slowpoke family of potassium channels. *J Biol Chem* **269**, 3921-3924.
71. Knaus HG, McManus OB, Lee SH, Schmalhofer WA, Garcia-Calvo M, Helms LM, Sanchez M, Giangiacomo K, Reuben JP, Smith AB, III, & . (1994c). Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry* **33**, 5819-5828.
72. Korovkina VP & England SK (2002). Molecular diversity of vascular potassium channel isoforms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**, 317-323.

73. Korovkina VP, Fergus DJ, Holdiman AJ, & England SK (2001). Characterization of a novel 132-bp exon of the human maxi-K channel. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C361-C367.
74. Kwon SH & Guggino WB (2004). Multiple sequences in the C terminus of MaxiK channels are involved in expression, movement to the cell surface, and apical localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15237-15242.
75. Lagrutta A, Shen KZ, North RA, & Adelman JP (1994). Functional differences among alternatively spliced variants of Slowpoke, a *Drosophila* calcium-activated potassium channel. *J Biol Chem* **269**, 20347-20351.
76. Lee K, Rowe IC, & Ashford ML (1995b). NS 1619 activates BKCa channel activity in rat cortical neurones. *Eur J Pharmacol* **280**, 215-219.
77. Lee K, Rowe IC, & Ashford ML (1995a). Characterization of an ATP-modulated large conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel present in rat cortical neurones. *J Physiol* **488 (Pt 2)**, 319-337.
78. Li HF, Chen SA, & Wu SN (2000). Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca(2+)-activated K⁺ current in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* **45**, 1035-1045.
79. Lippiat JD, Standen NB, Harrow ID, Phillips SC, & Davies NW (2003). Properties of BK(Ca) channels formed by bicistronic expression of hSloalpha and beta1-4 subunits in HEK293 cells. *J Membr Biol* **192**, 141-148.
80. Liu Y, Pleyte K, Knaus HG, & Rusch NJ (1997). Increased expression of Ca²⁺-sensitive K⁺ channels in aorta of hypertensive rats. *Hypertension* **30**, 1403-1409.
81. Loehn M, Jessner W, Fürstenau M, Wellner M, Sorrentino V, Haller H, Luft FC & Gollasch M (2001). Regulation of Calcium Sparks and Spontaneous Transient Outward Currents by RyR3 in Arterial Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res.* 89:1051-1057.)
82. Mahmoud SF, Bezzerides AL, Riba R, Lai GJ, Lovell PV, Hara Y, & McCobb DP (2002). Accurate quantitative RT-PCR for relative expression of Slo splice variants. *J Neurosci Methods* **115**, 189-198.
83. McManus OB, Harris GH, Giangiacomo KM, Feigenbaum P, Reuben JP, Addy ME, Burka JF, Kaczorowski GJ, & Garcia ML (1993). An activator of calcium-dependent potassium channels isolated from a medicinal herb. *Biochemistry* **32**, 6128-6133.
84. McManus OB, Helms LM, Pallanck L, Ganetzky B, Swanson R, & Leonard RJ (1995). Functional role of the beta subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* **14**, 645-650.

85. Meech RW (1978). Calcium-dependent potassium activation in nervous tissues. *Annu Rev Biophys Bioeng* **7**, 1-18.
86. Meredith AL, Thorneloe KS, Werner ME, Nelson MT, & Aldrich RW (2004). Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J Biol Chem* **279**, 36746-36752.
87. Minami K, Fukuzawa K, Nakaya Y, Zeng XR, & Inoue I (1993). Mechanism of activation of the Ca(2+)-activated K⁺ channel by cyclic AMP in cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. *Life Sci* **53**, 1129-1135.
88. Morita T, Hanaoka K, Morales MM, Montrose-Rafizadeh C, & Guggino WB (1997). Cloning and characterization of maxi K⁺ channel alpha-subunit in rabbit kidney. *Am J Physiol* **273**, F615-F624.
89. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, & Schäfer-Korting M (2003). Arzneimittelwirkungen. Stuttgart, WVG.
90. Nagaya N & Papazian DM (1997). Potassium channel alpha and beta subunits assemble in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **272**, 3022-3027.
91. Nardi A, Calderone V, Chericoni S, & Morelli I (2003). Natural modulators of large-conductance calcium-activated potassium channels. *Planta Med* **69**, 885-892.
92. Narumiya S, Ishizaki T, & Watanabe N (1997). Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* **410**, 68-72.
93. Navaratnam DS, Bell TJ, Tu TD, Cohen EL, & Oberholtzer JC (1997). Differential distribution of Ca²⁺-activated K⁺ channel splice variants among hair cells along the tonotopic axis of the chick cochlea. *Neuron* **19**, 1077-1085.
94. Nelson MT & Bonev AD (2004). The beta1 subunit of the Ca²⁺-sensitive K⁺ channel protects against hypertension. *J Clin Invest* **113**, 955-957.
95. Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, & Lederer WJ (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* **270**, 633-637.
96. Numberger M & Draguhn A (1996). Patch-Clamp-Technik. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
97. Ogut O & Brozovich FV (2003). Regulation of force in vascular smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol* **35**, 347-355.

98. Ohwada T, Nonomura T, Maki K, Sakamoto K, Ohya S, Muraki K, & Imaizumi Y (2003). Dehydroabiatic acid derivatives as a novel scaffold for large-conductance calcium-activated K⁺ channel openers. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 3971-3974.
99. Olesen SP, Watjen, F (1992). Benzimidazolone derivatives, their preparation and use.. European Patent Application EP0477819.
100. Olesen SP, Munch E, Moldt P, & Drejer J (1994a). Selective activation of Ca(2+)-dependent K⁺ channels by novel benzimidazolone. *Eur J Pharmacol* **251**, 53-59.
101. Olesen SP, Munch E, Watjen F, & Drejer J (1994b). NS 004--an activator of Ca(2+)-dependent K⁺ channels in cerebellar granule cells. *Neuroreport* **5**, 1001-1004.
102. Orio P, Rojas P, Ferreira G, & Latorre R (2002). New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News Physiol Sci* **17**, 156-161.
103. Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, & Jan LY (1991). Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* **349**, 305-310.
104. Patel HJ, Giembycz MA, Keeling JE, Barnes PJ, & Belvisi MG (1998). Inhibition of cholinergic neurotransmission in guinea pig trachea by NS1619, a putative activator of large-conductance, calcium-activated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther* **286**, 952-958.
105. Patterson AJ, Henrie-Olson J, & Brenner R (2002). Vasoregulation at the molecular level: a role for the beta1 subunit of the calcium-activated potassium (BK) channel. *Trends Cardiovasc Med* **12**, 78-82.
106. Peng W, Hoidal JR, & Farrukh IS (1999). Role of a novel KCa opener in regulating K⁺ channels of hypoxic human pulmonary vascular cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**, 737-745.
107. Pepine CJ (2004). What is the optimal blood pressure and drug therapy for patients with coronary artery disease? *JAMA* **292** (18), 2271-2273
108. Piskorowski R & Aldrich RW (2002). Calcium activation of BK(Ca) potassium channels lacking the calcium bowl and RCK domains. *Nature* **420**, 499-502.
109. Pluger S, Faulhaber J, Furstenau M, Lohn M, Waldschutz R, Gollasch M, Haller H, Luft FC, Ehmke H, & Pongs O (2000). Mice with disrupted BK channel beta1 subunit gene feature abnormal Ca(2+) spark/STOC coupling and elevated blood pressure. *Circ Res* **87**, E53-E60.
110. Quayle JM, Nelson MT, & Standen NB (1997). ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* **77**, 1165-1232.

111. Quirk JC & Reinhart PH (2001). Identification of a novel tetramerization domain in large conductance K(ca) channels. *Neuron* **32**, 13-23.
112. Ramanathan K, Michael TH, Jiang GJ, Hiel H, & Fuchs PA (1999). A molecular mechanism for electrical tuning of cochlear hair cells. *Science* **283**, 215-217.
113. Rogers DF (1996). Scorpion venoms: taking the sting out of lung disease. *Thorax* **51**, 546-548.
114. Ruttiger L, Sausbier M, Zimmermann U, Winter H, Braig C, Engel J, Knirsch M, Arntz C, Langer P, Hirt B, Muller M, Kopschall I, Pfister M, Munkner S, Rohbock K, Pfaff I, Rusch A, Ruth P, & Knipper M (2004). Deletion of the Ca²⁺-activated potassium (BK) alpha-subunit but not the BKbeta1-subunit leads to progressive hearing loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12922-12927.
115. Sadoshima J, Akaike N, Kanaide H, & Nakamura M (1988). Cyclic AMP modulates Ca-activated K channel in cultured smooth muscle cells of rat aortas. *Am J Physiol* **255**, H754-H759.
116. Sah P (1996). Ca(2+)-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* **19**, 150-154.
117. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, & Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
118. Sambrook J, Fritsch EF, & Maniatis T (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
119. Sammak PJ, Adams SR, Harootunian AT, Schliwa M, & Tsien RY (1992). Intracellular cyclic AMP not calcium, determines the direction of vesicle movement in melanophores: direct measurement by fluorescence ratio imaging. *J Cell Biol* **117**, 57-72.
120. Schmidt RF, Thews G, & Lang F (2000). *Physiologie des Menschen*. Berlin, Springer Verlag.
121. Schopperle WM, Holmqvist MH, Zhou Y, Wang J, Wang Z, Griffith LC, Keselman I, Kusnitz F, Dagan D, & Levitan IB (1998). Slob, a novel protein that interacts with the Slowpoke calcium-dependent potassium channel. *Neuron* **20**, 565-573.
122. Schreiber M, Wei A, Yuan A, Gaut J, Saito M, & Salkoff L (1998). Slo3, a novel pH-sensitive K⁺ channel from mammalian spermatozoa. *J Biol Chem* **273**, 3509-3516.
123. Schreiber M, Yuan A, & Salkoff L (1999). Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nat Neurosci* **2**, 416-421.

124. Shah M & Haylett DG (2000). The pharmacology of hSK1 Ca²⁺-activated K⁺ channels expressed in mammalian cell lines. *Br J Pharmacol* **129**, 627-630.
125. Shen KZ, Lagrutta A, Davies NW, Standen NB, Adelman JP, & North RA (1994). Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes: evidence for tetrameric channel formation. *Pflugers Arch* **426**, 440-445.
126. Siemer C, Bushfield M, Newgreen D, & Grissmer S (2000). Effects of NS1608 on MaxiK channels in smooth muscle cells from urinary bladder. *J Membr Biol* **173**, 57-66.
127. Somlyo AP & Somlyo AV (2003). Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* **83**, 1325-1358.
128. Somlyo AP & Somlyo AV (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231-236.
129. Tanaka Y, Meera P, Song M, Knaus HG, & Toro L (1997). Molecular constituents of maxi KCa channels in human coronary smooth muscle: predominant alpha + beta subunit complexes. *J Physiol* **502 (Pt 3)**, 545-557.
130. Taniguchi J, Furukawa KI, & Shigekawa M (1993). Maxi K⁺ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch* **423**, 167-172.
131. Teasdale RD & Jackson MR (1996). Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 27-54.
132. Tian L, Duncan RR, Hammond MS, Coghill LS, Wen H, Rusinova R, Clark AG, Levitan IB, & Shipston MJ (2001). Alternative splicing switches potassium channel sensitivity to protein phosphorylation. *J Biol Chem* **276**, 7717-7720.
133. Tian L, Knaus HG, & Shipston MJ (1998). Glucocorticoid regulation of calcium-activated potassium channels mediated by serine/threonine protein phosphatase. *J Biol Chem* **273**, 13531-13536.
134. Touyz RM (2000a). Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Rep* **2**, 98-105.
135. Touyz RM (2000b). Molecular and cellular mechanisms regulating vascular function and structure--implications in the pathogenesis of hypertension. *Can J Cardiol* **16**, 1137-1146.

136. Tseng-Crank J, Foster CD, Krause JD, Mertz R, Godinot N, DiChiara TJ, & Reinhart PH (1994). Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca(2+)-activated K⁺ channel isoforms from human brain. *Neuron* **13**, 1315-1330.
137. Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Mann GE, Vergara C, & Latorre R (1999). Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* **285**, 1929-1931.
138. Vasan RS, Beiser A, Seshadri S, Larson MG, Kannel WB, D'Agostino RB, & Levy D (2002). Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: The Framingham Heart Study. *JAMA* **287**, 1003-1010.
139. Vergara C, Latorre R, Marrion NV, & Adelman JP (1998). Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* **8**, 321-329.
149. Wallner M, Meera P, & Toro L (1996). Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca(2+)-sensitive K⁺ channels: an additional transmembrane region at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14922-14927.
141. Walsh MP, Kargacin GJ, Kendrick-Jones J, & Lincoln TM (1995). Intracellular mechanisms involved in the regulation of vascular smooth muscle tone. *Can J Physiol Pharmacol* **73**, 565-573.
142. Wang SX, Ikeda M, & Guggino WB (2003). The cytoplasmic tail of large conductance, voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ (MaxiK) channel is necessary for its cell surface expression. *J Biol Chem* **278**, 2713-2722.
143. Warrach S, Hacke W, Chung H, Luby M, Sullivan M, Noonan T, Chin YL, Fernandes L, Brunell R, & Bozik M (2002). Effect of MaxiPost on ischemic lesions in patients with acute stroke. The POST-010MR1 substudy. *Stroke* **33**(1), 383.
144. Wei A, Jegla T, & Salkoff L (1996). Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* **35**, 805-829.
145. Wei A, Solaro C, Lingle C, & Salkoff L (1994). Calcium sensitivity of BK-type KCa channels determined by a separable domain. *Neuron* **13**, 671-681.
146. Weiger TM, Hermann A, & Levitan IB (2002). Modulation of calcium-activated potassium channels. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **188**, 79-87.
147. Wierzbicki AS, Chowieńczyk PJ, Cockcroft JR, Brett SE, Watts GF, Jenkins BS, & Ritter JM (2004). Cardiovascular risk factors and endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)*.

148. Wu SN, Li HF, & Chiang HT (2001). Vinpocetine-induced stimulation of calcium-activated potassium currents in rat pituitary GH3 cells. *Biochem Pharmacol* **61**, 877-892.
149. Xia X, Hirschberg B, Smolik S, Forte M, & Adelman JP (1998). dSLo interacting protein 1, a novel protein that interacts with large-conductance calcium-activated potassium channels. *J Neurosci* **18**, 2360-2369.
150. Xia XM, Ding JP, & Lingle CJ (1999). Molecular basis for the inactivation of Ca²⁺- and voltage-dependent BK channels in adrenal chromaffin cells and rat insulinoma tumor cells. *J Neurosci* **19**, 5255-5264.
151. Xie J & McCobb DP (1998). Control of alternative splicing of potassium channels by stress hormones. *Science* **280**, 443-446.
152. Xu W, Liu Y, Wang S, McDonald T, Van Eyk JE, Sidor A, & O'Rourke B (2002). Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* **298**, 1029-1033.
153. Yamamura H, Ohi Y, Muraki K, Watanabe M, & Imaizumi Y (2001). BK channel activation by NS-1619 is partially mediated by intracellular Ca²⁺ release in smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* **132**, 828-834.
154. Yuan A, Santi CM, Wei A, Wang ZW, Pollak K, Nonet M, Kaczmarek L, Crowder CM, & Salkoff L (2003). The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family. *Neuron* **37**, 765-773.
155. Zarei MM, Zhu N, Alioua A, Eghbali M, Stefani E, & Toro L (2001). A novel MaxiK splice variant exhibits dominant-negative properties for surface expression. *J Biol Chem* **276**, 16232-16239.
156. Zerangue N, Jan YN, & Jan LY (2000). An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional Shaker channels lacking T1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3591-3595.
157. Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, & Jan LY (1999). A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* **22**, 537-548.
158. Zhou XB, Arntz C, Kamm S, Motejlek K, Sausbier U, Wang GX, Ruth P, & Korth M (2001). A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase. *J Biol Chem* **276**, 43239-43245.
159. Zhou XB, Schlossmann J, Hofmann F, Ruth P, & Korth M (1998). Regulation of stably expressed and native BK channels from human myometrium by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase. *Pflugers Arch* **436**, 725-734.

6.2 Danksagung

Diese Arbeit wurde als externe Doktorarbeit in der Abteilung Cardiovascular Diseases in der Sektion Cardiotechonology der Firma Aventis Pharma Deutschland GmbH (jetzt: Sanofi-Aventis) erstellt. Mein tiefer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Andreas E. Busch für die Möglichkeit, in seiner Abteilung meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen, für die Bereitstellung des Themas und dafür, dass ich alle meine Ideen umsetzen durfte.

Herrn Prof. Theodor Dingermann an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität zu Frankfurt am Main für die freundliche externe Betreuung dieser Arbeit.

Meinem Sektionsleiter Herrn Dr. Henning Vollert für die Unterstützung bei der Umsetzung meiner Ideen, das persönliche Interesse und das Vertrauen in meine Arbeit.

Im besonderen danke ich Herrn Dr. Carsten Strübing, der mir vorurteilsfrei seine vollste Unterstützung zukommen lies, für seine intensive wissenschaftliche Betreuung verbunden mit seiner fachlichen Kompetenz, seine Fähigkeit, mir nach negativen Ergebnissen Mut zu machen und neue Reserven zu wecken und sein persönliches Interesse .

Die Herren Dr. Rolf Vajna und PD Dr. Klaus Steinmeyer für die Einweisung in die Grundlagen der Molekularbiologie, die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft, das Korrekturlesen dieser Arbeit und ihr persönliches Interesse.

Herrn Dr. Thomas Licher für die Einarbeitung in die Immunfluoreszenzanalyse, die Erübrigung seiner Zeit für die Untersuchung der Präparate am konfokalen Mikroskop und seine Geduld.

Herrn Dipl. biol. Florian Bundis für die Durchführung der Western Blot-Experimente und die Bereitstellung der AAA-Mutante, die gute Zusammenarbeit und sein persönliches Interesse.

Herrn Dr. Matthias Schäfer für die Betreuung der Ca-Imaging-Experimente, sowie bei Frau Susanne Böhn für die gemeinsame Planung und Durchführung der Experimente sowie die gute Zusammenarbeit.

Herrn Stefan Müller und Herrn Andreas Hertler für die Einarbeitung in die Technik der Zwei-Elektroden Spannungsklemme; Herrn Stefan Müller zusätzlich für die Hilfe beim Erlernen der Patch-Clamp Technik und die Bereitstellung der Paxillinexperimente.

Beiden möchte ich besonders für die gute und freundliche Zusammenarbeit im Labor, ihre Geduld und ihren Humor danken.

Frau Dr. Hella Schöttelndreier und Frau Nicole Böhm für die freundliche Unterstützung in der Zellkultur.

Herrn Dr. Nicolas Flores-Herr für die Betreuung in Soft- und Hardwarefragen.

Mein weiterer Dank gilt Frau Sybill Meister, Dr. Astrid Weyermann, Dr. Constanze Scherer, Kerstin Klämbt, Dr. Andre Markmann, Beate Preitz, Elsa Kern, Silke Sauerborn und Inge Kress-Fischer für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Ihre Hilfsbereitschaft.

Zuletzt gilt mein Dank all denen Kollegen von sanofi-aventis, die mich während meiner Promotionszeit in der Firma gefördert und unterstützt haben, indem sie ihren Beitrag zu dem ausgezeichneten Arbeitsumfeld geleistet haben, welches ich am Standort Frankfurt-Höchst vorfand.

Besonders das herzliche Verhältnis zu den Tiermedizinerinnen, die mich vorurteilsfrei und zuvorkommend als Zigeunerlilly aufgenommen haben, wird mir lange in Erinnerung bleiben und auch diejenigen, die ihre Arbeitszeit geopfert haben, um anonyme Briefe über mich zu verfassen, haben mir während meiner Anwesenheit in der Abteilung sehr geholfen.

6.3 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name, Vorname: Roth, Sabine
Geburtsdatum: 03.05.1974
Geburtsort: Büdingen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Wolf-Jürgen Roth
Elvira Roth, geb. Bötz

Schulbildung

Grundschule Vonhausen, Gemeinde Büdingen
Wolfgang-Ernst-Gymnasium, Büdingen

Berufsbildung

April 1995 Beginn des Pharmaziestudiums an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt

August 1997 1. Pharmazeutisches Staatsexamen

Oktober 1999 2. Pharmazeutisches Staatsexamen

Nov 1999-April 2000 Praktikum Weingarten-Apotheke, Freiburg

Mai 2000-Oktober 2000 Praktikum in der medizinischen Abteilung von Aventis Pharma Deutschland GmbH, Bad Soden

Dezember 2000 3. Pharmazeutisches Staatsexamen

Januar 2001-April 2004 Promotion im Labor von Dr. Carsten Strübing, DG Cardiovascular, Aventis Pharma Deutschland GmbH unter der Betreuung von Prof. Dr. A. Busch und Prof. Dr. T. Dingermann

6.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken und Experimente sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Teile dieser Arbeit werden in einer Patentanmeldung der Firma Sanofi-Aventis verwendet.

Frankfurt, den 26.06.2005