

**Untersuchung der Modulation von
erg - Kaliumkanälen durch TRH
in Hypophysenzellen der Ratte
(*Rattus rattus*, von Waldheim, F., 1803)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Niklas M. Kirchberger
aus Buchholz in der Nordheide

Hamburg 2006

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professorin Dr. Christiane Bauer
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. Konrad Wiese
Tag der Disputation: 17. November 2006

Hamburg, den 30. Oktober 2006



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Lieberei'.

Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	10
2.1 Zellkultur	10
2.1.1 GH ₃ /B ₆ -Zellen	10
2.1.2 MMQ-Zellen	11
2.1.3 CHO-Zellen	11
2.2 Primärzellkultur	11
2.3 Medien und Lösungen für die Zellkultur	13
2.4 Heterologe Expression	14
2.5 Verwendete Lösungen	17
2.6 Chemikalien	18
2.7 Patch-Clamp-Technik	19
2.8 Datenerfassung und Auswertung	20
2.9 Herstellerverzeichnis	21
3 Ergebnisse	22
3.1 Modulation von nativen erg-Strömen in GH ₃ /B ₆ -Zellen durch TRH	22
3.2 Modulation des endogenen erg-Stromes in laktotropen Hypophysen-primärkulturzellen der Ratte durch TRH	25
3.3 Überexpression von rerg-Kanälen in GH ₃ /B ₆ -Zellen	26
3.4 Fluoreszenzaufnahmen der EGFP- und DS-Red markierten rerg-Kanäle	29
3.5 Modulation von überexprimierten rerg1a- und rerg1b-Kanälen durch TRH in GH ₃ /B ₆ -Zellen	30
3.5.1 TRH-Effekte auf die Aktivierung	30
3.5.2 Einfluss von TRH auf die Deaktivierungskinetik der erg-Ströme	33
3.5.3 TRH-Effekte auf die Aktivierungskinetik der verschiedenen erg Ströme	35
3.5.4 Effekte von TRH auf die Inaktivierung und Leitfähigkeit von erg-Strömen	37
3.6 Vergleich der biophysikalischen Eigenschaften von homomeren und heteromeren erg1-Kanälen in CHO-Zellen	40

Inhaltsverzeichnis

3.7 PMA-induzierte Effekte auf erg-Kanäle.....	44
3.7.1 Einfluss von PMA auf erg-Kanäle in GH ₃ /B ₆ -Zellen.....	45
3.7.2 Einfluss von PMA auf erg-Kanäle in MMQ-Zellen.....	49
3.7.3 Einfluss von TRH erg-Kanälen in MMQ-Zellen.....	53
3.7.4 Einfluss von TRH und PMA auf erg-Kanälen in CHO-Zellen.....	56
4 Diskussion.....	59
4.1 Biophysikalische Eigenschaften von erg-Strömen in GH ₃ /B ₆ -Zellen und Modulation durch TRH.....	59
4.1.1 GH ₃ /B ₆ -Zellen als Expressionssystem für die Analyse der durch TRH ausgelösten erg-Strom-Modulation.....	60
4.1.2 Unterschiede zwischen den biophysikalischen Eigenschaften von rerg1a und rerg1b.....	61
4.1.3 Eigenschaften der erg-Ströme aus koexprimierten rerg1a- und rerg1b-Untereinheiten.....	62
4.1.4 Unterschiede in der TRH-induzierten Modulation von rerg1a- und rerg1b-Kanälen.....	64
4.1.5 TRH verursachte Modulation von heteromeren rerg1a/1b-Kanälen.....	65
4.2 Durch PMA verursachte Modulation der erg-Kanäle.....	67
4.2.1 Einfluss von PMA auf die erg-Ströme in GH ₃ /B ₆ -Zellen.....	67
4.2.2 Einfluss von PMA auf die erg-Ströme in MMQ-Zellen.....	68
4.2.3 Einfluss von PMA auf heterolog in CHO-Zellen exprimierte erg-Ströme.....	69
5 Zusammenfassung.....	71
6 Literaturverzeichnis.....	73
7 Abkürzungen.....	81

1 Einleitung

Die Kaliumkanäle sind eine große, heterogene Gruppe von Ionenkanälen, die eine Vielzahl unterschiedlicher physiologischer Funktionen wahrnehmen. So sind sie an der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials sowie an der Signalübertragung an elektrisch erregbaren Membranen beteiligt (Pongs, 1999), und sie tragen zur Repolarisation nach einem Aktionspotenzial bei. Des Weiteren wirken sie regulatorisch bei der neuronalen Erregbarkeit und der Freisetzung von Hormonen und Transmittern. Eine wichtige Funktion haben sie außerdem bei der Rhythmik des Herzschlages. Dort sind die durch Kaliumionen getragenen Ströme für die Repolarisation des Herzaktionspotentials verantwortlich.

Die in dieser Arbeit untersuchten *erg*-Kanäle (*ether-à-go-go-related-gene*) gehören zu den spannungsabhängigen Kaliumkanälen (K_v). Sie sind Angehörige der Unterfamilie der *Ether-à-go-go* (EAG)-Kanäle (K_v11). Die Bezeichnung *Ether-à-go-go* erfolgte nach der Beobachtung einer *Drosophila*-Mutante unter Äthernarkose, deren Beinbewegungen an einen gogo-ähnlichen Tanz erinnerten (Warmke et al., 1991). Jeder *erg*-Kanal wird aus vier Untereinheiten, Monomeren, gebildet, die wiederum aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) bestehen. Die vierte Transmembrandomäne fungiert als Spannungssensor, zwischen der fünften und der sechsten Transmembrandomäne befindet sich die Porenregion (P).

Die vier Untereinheiten bilden zusammen ein Tetramer. Lagern sich vier gleiche Untereinheiten zusammen, bilden sich sogenannte Homomultimere, bei verschiedenen Untereinheiten spricht man von Heteromultimeren.

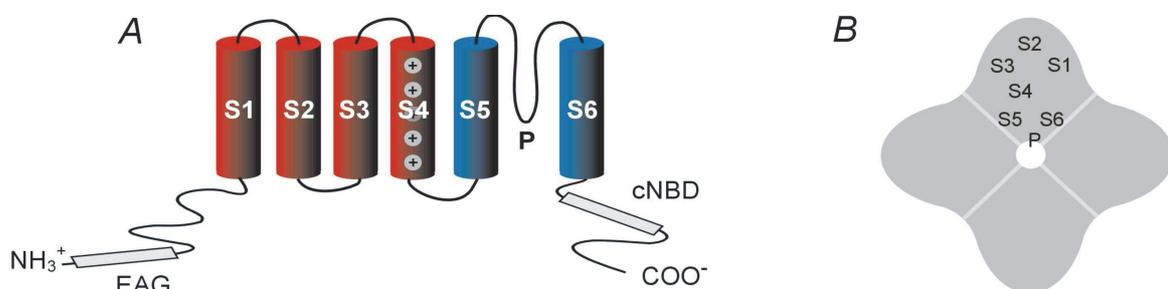


Abbildung 1: Aufbau der *erg*-Kanäle A, Die sechs Transmembrandomänen mit dem Spannungssensor S4 und der Porenregion zwischen S5 und S6. Am N-Terminus ist die EAG-Kanal typische EAG-Domäne lokalisiert, während sich am C-Terminus eine Bindungsstelle für cyclische Nucleotide (cNBD) befindet. B, Schematische Darstellung der vier aneinander gelagerten Kanaluntereinheiten.

Der prominenteste von I_{kr} -Kanälen getragene Strom ist die schnell aktivierende Komponente (I_{kr}) des verzögerten, gleichgerichteten Stroms des Herzens. Dieser in Sinusknoten-Zellen des Herzens zum ersten Mal beschriebene I_{kr} -Strom (Shibasaki, 1987) ist für die Repolarisation des Herzaktionspotentials mitverantwortlich. Ein Ausfall oder eine Blockade des I_{kr} durch Mutation oder pharmakologische Substanzen führt zu einer Verlängerung des Aktionspotentials in den Herzmuskelzellen, dem so genannten LQT-Syndrom. Im Extremfall kann dies zu verfrühten Nachpolarisationen und dem Auftreten von „torsade de pointes“ mit tödlichen Folgen führen (Curran et al., 1995). Nach Klonierung der für den I_{kr} verantwortlichen Kanäle konnten diese als *humane ether-à-go-go-related-gene* (HERG) Kanäle identifiziert werden (Warmke & Ganetzky, 1994; Sanguinetti et al., 1995; Trudeau et al., 1995). Durch detaillierte biophysikalische Untersuchungen des HERG-Kanals konnten die besonderen Schalteigenschaften, die von Shibasaki (1987) beschrieben wurden, bestätigt werden.

Eine besondere Eigenschaft der HERG-Kanäle besteht darin, dass sie schneller inaktivieren als sie aktivieren und dass ihre Erholung von der Inaktivierung schneller ist als ihre Deaktivierung. Daraus ergibt sich die funktionelle Einwärtsgleichrichtung der I_{kr} -Ströme (Spector et al., 1996; Wang et al., 1997).

Abbildung 2 beschreibt schematisch das Schaltverhalten der Kanäle. Bei negativen Membranpotentialen befinden sich die Kanäle in einem deaktivierten, geschlossenen Zustand. Bei einer Depolarisation aktivieren die Kanäle. Da allerdings gleichzeitig zu der relativ langsamen Aktivierung eine deutlich schnellere Inaktivierung erfolgt, wird der Auswärtsstrom sofort wieder reduziert. Bei einer folgenden Repolarisation erholen sich die Kanäle sehr schnell von ihrer Inaktivierung, und es kommt zu einem starken auswärtsgerichteten Strom (Abbildung 2 oben). Anschließend deaktivieren die Kanäle relativ langsam, wobei sie wieder in ihren geschlossenen Zustand übergehen.

Bei Spannungsklemm-Messungen in 5 mM Kaliumlösung kommt es bei der Repolarisation auf Potentiale, die negativer sind als das mittels der Nernst-Gleichung berechnete Gleichgewichtspotential (ca. -80 mV), zu einem Einwärtsstrom anstelle eines Auswärtsstroms (Abbildung 2 unten).

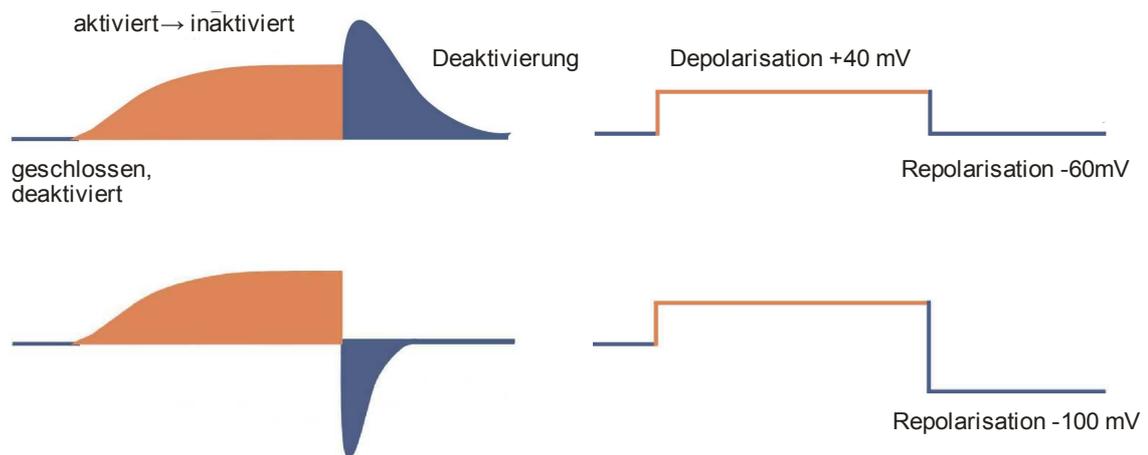


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Schaltverhaltens der erg-Kanäle Bei negativen Haltepotentialen von -60 mV ist der erg-Kanal geschlossen und deaktiviert. Durch einen depolarisierenden Puls werden die Kanäle aktiviert. Aufgrund der zeitgleichen Inaktivierung kommt es jedoch nur zu einem kleinen Auswärtsstrom. Nach Repolarisation auf Potentiale positiver als das Gleichgewichtspotential von Kalium (E_K) erfolgt ein Auswärtsstrom (oben). Ist die Repolarisation negativer als E_K erfolgt ein Einwärtsstrom (unten).

Durch die Verwendung von erg-Kanal-spezifischen Blockern war die Isolation des endogenen erg-Stroms im Herzen (I_{kr}) möglich. Bei einem Vergleich zwischen den endogenen erg-Strömen des Herzens und den heterolog exprimierten HERG-Kanälen offenbarten sich jedoch Unterschiede hauptsächlich in Bezug auf ihre Deaktivierungskinetiken (Bauer & Schwarz, 2001).

Im Herzen wurde 1997 eine Spleißvariante des erg1-Kanals (=erg1a), der rerg1b-Kanal kloniert (Lees-Miller et al., 1997; London et al., 1997). Diesem fehlt ein großer Teil des N-Terminus (Aminosäuren 1-376), er verfügt jedoch über einen kurzen, alternativen N-Terminus von 36 Aminosäuren. Die am distalen N-Terminus des erg1a befindliche EAG oder PAS Domäne hat einen großen Einfluss auf die langsame Deaktivierung des erg1a-Kanals (Schönherr & Heinemann, 1996; Spector et al., 1996; Wang et al., 1998). Durch ihr Fehlen beim erg1b kommt es bei diesem zu einer sehr viel schnelleren Deaktivierung des Stroms (Lees-Miller et al., 1997; London et al., 1997).

Es wurde nun vermutet, dass die oben erwähnten Unterschiede in den Deaktivierungseigenschaften zwischen HERG und I_{kr} durch die Bildung heteromultimerer Kanäle aus koexprimierten erg1a- und erg1b-Kanaluntereinheiten verursacht werden, da im Herzgewebe beide Spleißvarianten gefunden wurden (Lees-Miller et al., 1997; London et al., 1997). Eine Koexpression der beiden erg-Untereinheiten und die Bildung von heteromeren erg1a/1b-Kanälen konnte durch Koimmunopräzipitationsstudien nachgewiesen werden (Jones et al., 2004).

Weitere aktuelle Studien haben gezeigt, dass erg1a und erg1b in vielen Bereichen des

erwachsenen Mäusegehirns auf Proteinebene gemeinsam exprimiert werden (Guasti et al., 2005). Die hohe Expression des erg1b-Kanals tritt immer im Zusammenhang mit dem erg1a-Kanal auf. Eine Koexpression von erg1a und erg1b Transkripten konnte ebenfalls in der glatten Muskulatur (Ohya et al., 2002), verschiedenen Tumorzelllinien (Crociani et al., 2003) sowie in Gehirn- und Hypophysengeweben (Hirdes et al., 2005) nachgewiesen werden.

Die Hypophyse oder Hirnanhangsdrüse ist eine der wichtigsten Drüsen des Körpers. Sie ist über den Hypophysenstiel direkt mit dem Gehirn verbunden. Die Hypophyse besteht aus drei Teilen: dem Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse), dem Hinterlappen (Neurohypophyse) und dem Zwischenlappen. Letzterer wird oft der Adenohypophyse zugeordnet. Die Neurohypophyse gehört als Teil des Hypothalamus unmittelbar zum Gehirn. Sie selbst enthält keine hormonsezernierenden Zellen. Die Adenohypophyse hingegen ist eine echte Drüse. Sie ist über ein Pfortadersystem mit dem Hypothalamus verbunden, durch das dieser die Hypophysenhormonausschüttung durch „Releasing“- und „Inhibiting“-Faktoren steuern kann.

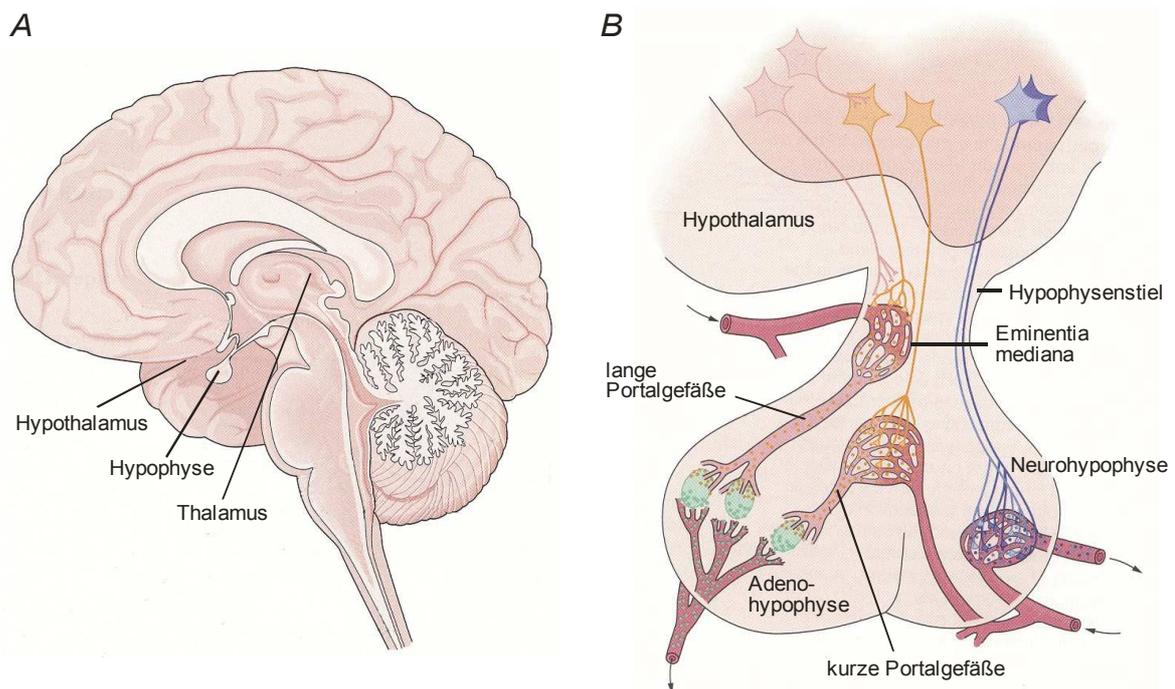


Abbildung 3: Lage und Aufbau der Hypophyse A, Ein Median-Sagittalschnitt durch das menschliche Gehirn zeigt die Lage des Hypothalamus und der Hypophyse. B, Kontrolle der Hypophyse durch den Hypothalamus. Peptiderge Neurone geben Oxytocin und Vasopressin über den Hypophysenhinterlappen in den Blutkreislauf ab (blau). Die Regulation des Hypophysenvorderlappens erfolgt über peptiderge Neurone, die stimulierende oder inhibierende Hormone synthetisieren (gelb). (Verändert nach Kandel, Schwarz & Jessel (1993), Principles of Neural Sciences, Elsevier Science Publ., New York)

Die verschiedenen Zellen der Hypophyse sind in Anlehnung an die von ihnen gebildeten und sezernierten Hormone benannt. Die Steuerung ihrer sekretorischen Funktion erfolgt direkt vom Hypothalamus. Die melanotropen Zellen des Zwischenlappens, sowie die laktotropen, somatotropen und thyreotropen Zellen der Adenohypophyse werden durch „Inhibiting“-Faktoren tonisch gehemmt. Durch eine synergistische Kombination von Absenken der „Inhibiting“-Faktoren und Anstieg der „Releasing“-Faktoren kommt es zu einer Steigerung der sekretorischen Aktivität. Meistens wird die Sekretion mehrerer Hypophysenhormone durch diese hypothalamischen Faktoren reguliert.

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Zellen werden die corticotropen und gonadotropen Zellen der Adenohypophyse nicht tonisch gehemmt. Bei ihnen wird die Hormonsekretion hauptsächlich über die Ausschüttung spezifischer „Releasing“-Faktoren gesteuert.

Bei laktotropen Zellen wirkt vor allem Dopamin hemmend auf die Prolaktinsekretion, wohingegen das Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) einen sekretionsfördernden Einfluss hat.

Eine wichtige Funktion für den Wirkmechanismus der Steuerung der Hormonsekretion hat die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Die laktotropen Zellen sind, wie viele hormonesezernierende Zellen auch, elektrisch erregbar. Sie generieren spontan Aktionspotentiale, die vorwiegend durch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen getragen werden. Dadurch erhöht sich temporär die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration. Sowohl Dopamin als auch TRH bewirken eine spezifische Änderung der elektrischen Aktivität. Durch diese Änderungen des Membranpotentials können sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle öffnen, da sich die Aktivierungsschwelle für diese Kanäle in der Nähe des für laktotrope Zellen üblichen Ruhepotentials von -40 mV bis -60 mV befindet. Eine Depolarisation führt somit zu einem Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Zur Wirkung von TRH auf zellulärer Ebene wurden schon seit langem Untersuchungen durchgeführt. Bereits 1975 zeigte Kidokoro an klonierten Hypophysenvorderlappen-Zellen, dass diese Zellen Ca^{2+} -getragene Aktionspotentiale generierten. Durch TRH konnte die Frequenz dieser Aktionspotentiale gesteigert werden.

Die TRH-Antwort wird in zwei Phasen eingeteilt. Diese bestehen elektrophysiologisch aus einer Hyperpolarisation und einer anschließenden Depolarisation, durch die ein Anstieg der Aktionspotentialfrequenz erfolgt.

Nach Bindung von TRH am TRH-Rezeptor, einem Rezeptor mit sieben membrandurchspannenden Domänen, erfolgt die Übertragung des Signals in das Zellinnere über heterotrimere G-Proteine. In der ersten Phase kommt es zu einer Aktivierung eines G-Proteins aus der $G_{q/11}$ -Familie. Über die α -Untereinheiten des Proteins wird die Phospholipase C aktiviert. Dadurch wird aus Phosphoinositolbisphosphat vermehrt Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) gebildet. IP3 setzt aus intrazellulären Speichern Ca^{2+} frei, wodurch ein transienter Ca^{2+} -Anstieg erfolgt. Dieser Calcium-Transient führt zu einem Öffnen von Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanälen. Durch den Ausstrom der Kaliumionen verschiebt sich das Membranpotential in Richtung Kaliumgleichgewichtspotential. Es kommt zu einer Hyperpolarisation (Corrette et al., 1995). Diese erste Phase der elektrischen TRH-Antwort ist ohne Einfluss auf die Sekretion.

Die zweite Phase wird durch eine reduzierte K^+ -Leitfähigkeit ausgelöst (Ozawa & Sand, 1986). Diese wird hauptsächlich durch eine Reduktion eines einwärtsgerichteten Kaliumstroms verursacht. Dieser Strom wurde in GH_3/B_6 -Zellen als $I_{\text{K,IR}}$ beschrieben (Bauer et al., 1990). Durch die Reduktion des $I_{\text{K,IR}}$ wird die Membran depolarisiert, sodass es zu einer erhöhten Frequenz von Aktionspotentialen kommt, die durch spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle getragen werden (Corrette et al., 1995). Der durch den Ca^{2+} -Einstrom bedingte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist einer

der Auslöser für die Sekretion von Prolaktin.

Die zu den zwei Phasen führenden intrazellulären Vorgänge sind in Abbildung 4 schematisch zusammengefasst.

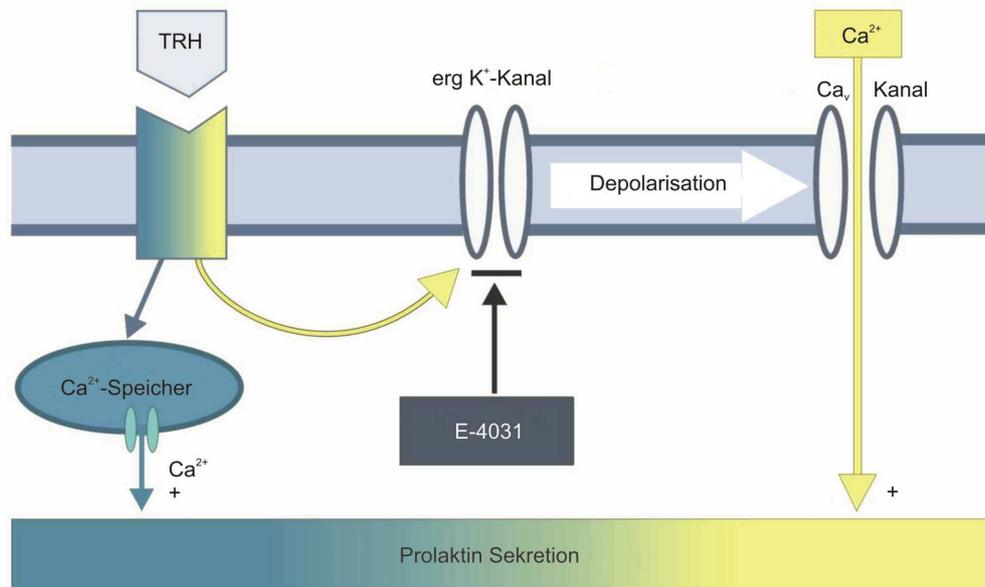


Abbildung 4: Schema der TRH-induzierten Signalkaskade In der ersten Phase (grün) führt die Aktivierung des TRH-Rezeptors über ein G-Protein der $G_{q/11}$ -Familie zu einer Bildung von IP_3 und DAG. IP_3 setzt aus intrazellulären Speichern Ca^{2+} frei, sodass $[Ca^{2+}]_i$ ansteigt. Calciumabhängige Kaliumkanäle öffnen sich und es kommt zu einem Kaliumausstrom, wodurch eine Hyperpolarisation ausgelöst wird. In der zweiten Phase (gelb) kommt es zu einer G-Protein gekoppelten Modulation des erg-Kanals. Dadurch kommt es zu einer Depolarisation des Membranpotentials, wodurch spannungsabhängige Calciumkanäle aktivieren. Durch diese kommt es zu einem Einstrom von Calcium, der die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration weiter erhöht. Durch die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration kommt es zu Prolaktinsekretion.

Um die für die Modulation benötigte Signalkaskade nicht zu beeinträchtigen, wurden die Messungen mit der Perforated-Patch-Technik durchgeführt (Horn und Marty, 1988). Bei dieser Messmethode wird der Pipettenlösung Nystatin zugegeben. Dieses bildet Poren in der Zellmembran, die vor allem für kleine Kationen und weniger für Anionen durchlässig sind. Durch diese Poren wird ein elektrischer Zugang zu den Zellen gebildet. Bei dieser Messmethode werden keine größeren Moleküle oder Botenstoffe aus der Zelle ausgewaschen, so dass intrazelluläre Signalwege erhalten bleiben. Es ist mit dieser Technik möglich, stabile Messungen über längere Zeiträume durchzuführen, ohne dass die Signalkaskade beeinträchtigt wird, so dass die Modulation der Kanäle über längere Zeit erfolgen kann.

In den laktotropen Zellen der Hypophyse ist der erg-Strom von besonderer Bedeutung für die Steuerung der Sekretion von Prolaktin. Die Inhibition des erg-Stroms durch das vom Hypothalamus gebildete Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) war die erste Rezeptor gekoppelte Modulation eines erg-Kanals, die beschrieben wurde (Bauer et al., 1990; Corrette et al., 1996; Schäfer et al., 1999).

Wie die laktotropen Hypophysenzellen verfügen auch die klonalen Hypophysentumorzelllinien GH₃ und GH₃/B₆ über TRH-Rezeptoren, die an die endogene Signalkaskade zur Modulation des erg-Kanals gekoppelt sind. Diese Ankopplung erfolgt über G-Proteine (Bauer et al., 1990; Barros et al., 1992, 1993; Miranda et al., 2005).

Durch TRH werden sowohl die endogenen GH₃/B₆ erg-Kanäle als auch heterolog exprimierten rerg-Kanäle in ihren Eigenschaften verändert. Dazu gehört eine Reduktion des Stroms, eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu positiveren Potentialen, eine Verlangsamung der Aktivierung, sowie eine Beschleunigung der Deaktivierung (Bauer et al., 1990; Bauer, 1998; Barros et al., 1998; Schledermann et al., 2001).

Für die meisten dieser Effekte scheint der proximale Teil des HERG1a-N-Terminus von Bedeutung zu sein, wie durch Untersuchungen mit einer HERG1a-Deletionsmutante, die zusammen mit TRH-Rezeptoren in *Xenopus* Oocyten exprimiert wurde, bestätigt werden konnte.

Die erg1a (HERG) K⁺-Kanaluntereinheiten und die Spleißvariante erg1b sind in vielen Geweben koexprimiert, und es konnte gezeigt werden, dass die erg1a- und erg1b-Kanaluntereinheiten heteromere erg-Kanäle im Herzen und Gehirn bilden. Über die Modulation von erg1a durch das Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) gibt es viele Untersuchungen, doch existierten bisher keine vergleichbaren Daten für erg1b. Da der Spleißvariante erg1b ein großer Bereich des N-Terminus fehlt, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die beiden Spleißvarianten rerg1a und rerg1b in der gleichen Weise moduliert werden und wie sich heteromere erg1a/erg1b-Kanäle bezüglich der TRH-Modulation verhalten. Dazu benötigt man ein heterologes Expressionssystem, in dem der TRH-Rezeptor neben den Spleißvarianten exprimiert wird. Dafür bieten sich GH₃/B₆-Zellen an, die den TRH-Rezeptor endogen exprimieren und in die die cDNA der verschiedenen erg-Kanäle injiziert werden kann. Der Vorteil der Verwendung dieser Zelllinie als Modell für laktotrope Hypophysenzellen besteht darin, dass die TRH-Rezeptoren der GH₃/B₆-Zellen an eine native Signalkaskade angeschlossen sind, die an der Regulation des erg-Kanals beteiligt ist und auf die somit zurückgegriffen werden kann. Die native Signalkaskade der GH₃/B₆-Zellen war ebenfalls in der Lage, heterolog

überexprimierte erg-Kanäle vergleichbar mit den endogenen erg-Kanälen zu modulieren. Um weitere Erkenntnisse über die Modulation der erg-Kanäle zu erhalten, sollten zusätzlich Versuche mit dem Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) als Proteinkinase C (PKC) Aktivator durchgeführt werden. Da durch die direkte Aktivierung der PKC ein ähnlicher Effekt auf die erg-Kanäle ausgeübt werden kann, wie durch die Applikation von TRH, wurde vermutet, dass die PKC an der Modulation des erg-Stroms beteiligt ist. Da für die Wirkung von PMA keine TRH-Rezeptoren benötigt werden, sollte untersucht werden, ob PMA in der Lage ist, erg-Ströme in MMQ-Zellen zu beeinflussen, da diese zwar über endogene erg-Ströme verfügen, nicht jedoch über TRH-Rezeptoren. Vergleichend zu den Ergebnissen der TRH-Modulation der erg-Ströme in GH₃/B₆-Zellen wurden daher Messungen durchgeführt, bei denen PMA auf verschiedene in MMQ-Zellen exprimierte erg1-Kanäle appliziert wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden in 50 ml Zellkulturflaschen (Nunc) bei 95% Luft, 5% CO₂ und 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre in einem Inkubator gehalten. Die Umsetzung der adhärent wachsenden GH₃/B₆- und CHO-Zellen erfolgte folgendermaßen: zunächst wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen nach Zugabe von Trypsin-EDTA (Gibco) ca. drei Minuten inkubiert und vom Flaschenboden gelöst. Der Vorgang wurde durch Zugabe von frischem Medium gestoppt. Die Zellen wurden anschließend mit einer Pasteurpipette vom Boden der Flasche abgespült und vereinzelt. Es wurden ca. 5×10^5 Zellen mit einer Pipette aufgenommen und in eine neue Kulturflasche überführt. Diese wurde dann mit 10 ml frischem Medium aufgefüllt.

Für die elektrophysiologischen Versuche wurden die Zellen auf 12 mm große mit Poly-D-Lysin beschichtete Glasplättchen ausgesät und in 35 mm Zellkulturschälchen (Nunc) mit Medium gelagert.

2.1.1 GH₃/B₆-Zellen

Die GH₃/B₆-Zelllinie geht aus einem Subklon der GH₃-Zelllinie hervor, die ursprünglich aus einem Rattenhypophysentumor gewonnen wurde (Tashjian et al., 1968). Diese somatomammotrope Zelllinie ist in der Lage, Prolaktin und Wachstumshormon (Growth Hormone, GH) zu sezernieren. Des weiteren verfügt sie über endogene Rezeptoren für Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH), Vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Cholecystokinin (CCK) und Somatostatin (SST). Zudem weisen die GH₃/B₆-Zellen endogene erg-Kanäle auf.

Da die GH₃/B₆-Zellen funktionelle endogene TRH-Rezeptoren besitzen, deren Aktivierung einen Anstieg der Prolaktinsekretion sowie eine Modulierung der erg-Kanäle bewirkt, sind sie ein gut geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der TRH-Signalkaskade (Schledermann et al., 2001).

Das typische Wachstum der Zellen erfolgt perlenschnurartig und adhäsiv am Boden der Kulturflasche. Sie wurden einmal pro Woche umgesetzt und mit neuem Medium versorgt.

2.1.2 MMQ-Zellen

Auch diese Zelllinie wurde ursprünglich aus einem Rattenhypophysentumor gewonnen (Judd et al., 1988). Diese Zelllinie sezerniert ausschließlich Prolaktin und verfügt neben Rezeptoren für VIP, SST und Acetylcholin auch über D₂-Rezeptoren für Dopamin, jedoch keine TRH-Rezeptoren.

MMQ-Zellen wachsen in Zellverbänden frei flottierend im Medium. Aufgrund dieser Eigenschaft wurden sie im Gegensatz zu den anderen hier verwendeten Zelllinien für die elektrophysiologischen Untersuchungen mit langkettigem Poly-D-Lysin auf den Glasscheiben adhäriert.

Die Zellen wurden je nach Wachstum zwei bis drei Mal pro Woche umgesetzt und mit neuem Medium versorgt, wozu sie zur mechanischen Dissoziation mit einer Pasteurpipette vereinzelt wurden. Etwa ein Sechstel des ursprünglichen Kulturvolumens wurde in neue Flaschen überführt und mit frischem Medium aufgefüllt.

2.1.3 CHO-Zellen

Diese Zelllinie entstammt aus dem Ovar des chinesischen Hamsters (Chinese Hamster Ovary, Puck et al. 1958). Das Besondere dieser Zelllinie ist, dass sie über nahezu keine endogenen spannungsabhängigen Ionenkanäle verfügt. Das macht sie zu einem idealen heterologen Expressionssystem, da in ihr die heterolog exprimierte Ionenkanäle fast ohne Beeinflussung von anderen Kanälen gemessen werden können. Das Umsetzen erfolgte alle zwei bis drei Tage.

2.2 Primärzellkultur

Versuchstiere

Die für die Experimente verwendeten Ratten waren Wistar-Ratten (Versuchstierhaltung, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg). Die Tiere wurden bei ca. 21°C und 50% Luftfeuchtigkeit in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

Präparation der Hypophyse

Die Versuche wurden gemäß der Tierversuchsrichtlinien des UKE Hamburg durchgeführt. Die Ratten wurden zunächst mit Forene (Abbott, Wiesbaden) narkotisiert. Anschließend wurden sie mit einer Guillotine dekapitiert. Die Kopfhaut wurde mit einem Skalpell mit zwei Schnitten lateral durchtrennt. Entlang dieser Schnitte wurde die Schädeldecke mit einer kleinen Knochenschere geöffnet. Das Gehirn wurde vorsichtig aus dem Schädel entnommen. Nun war die von einem Diaphragma bedeckte Hypophyse gut sichtbar. Nach Entfernung des Diaphragmas mit einer spitzen Pinzette konnte die Hypophyse entnommen werden.

Dissoziation und Resuspension der Hypophysenzellen in einer Zellkultur

Um die Hypophysenzellen zu dissoziieren wurde die Hypophyse zunächst in Dispersionsmedium überführt und in ca. 1 mm kleine Stücke zerschnitten. Die Stücke wurden anschließend in 10 ml steril gefilterte Kollagenase-Lösung gegeben und mit einer Pipette gründlich durchmischt. Das Dissoziieren der Zellen erfolgte unter leichtem Schütteln für 30 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad. Während dieser Zeit wurden die Zellen immer wieder mit einer Pipette durchmischt. Nach dieser enzymatischen Behandlung wurde die Zellsuspension zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Resuspension des Zellpellets erfolgte in 1 ml DMEM/BSA.

Die Zellsuspension wurde anschließend auf 10-14 Zellkulturschalen (35 mm Durchmesser, Nunc) verteilt, die mit Poly-D-Lysin beschichtet waren. Die Sedimentation der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ in einer wassergesättigten Atmosphäre. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Nährmedium überschichtet.

Nach 2-3 Tagen wurde das Nährmedium unter sterilen Bedingungen abgesaugt und durch neues, vorher auf 37°C erwärmtes Medium ersetzt. Auf diese Weise konnten die Zellkulturen bis zu 30 Tage gehalten werden.

2.3 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Für die verschiedenen Zelllinien wurden eigene definierte Nährmedien hergestellt:

Medium für GH₃/B₆-Zellen:

- 82% Ham's F12 (Sigma)
- 15% Pferdeserum (Roche)
- 2,5% Fötale Kälberserum (Biother GmbH)
- 0,5% L-Glutamin (Sigma)

Medium für MMQ-Zellen:

- 90% RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin (Gibco BRL)
- 7,5% Pferdeserum (Roche)
- 2,5% Fötale Kälberserum (Biother GmbH)

Medium für CHO-Zellen:

- 89,5% MEM alpha Medium (Gibco BRL)
- 10% Fötale Kälberserum (Biother GmbH)
- 0,3% L-Glutamin (Sigma)
- 100 U/ml Penicillin (Sigma)
- 100 µg/ml Streptomycin (Sigma)

Medium für Primärkultur:

- 100 ml Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM, Gibco BRL)
- 11 ml Fötale Kälberserum (FCS, Biother GmbH)
- 1 ml 200 mM L-Glutamin mit Penicillin (10 000 U) und Streptomycin (10 mg), (PSG, Sigma)

DMEM/BSA

- 100 ml DMEM
- 100 mg BSA

Kollagenase-Lösung

- 30 mg Kollagenase (Typ: CLSII, Biochem KG)
- 10 ml Dispersionsmedium
- kurz vor Gebrauch in 15 ml Röhrchen ansetzen.

Poly-D-Lysin-Lösung

Poly-D-Lysin, 5 mg (Sigma)

in 50 ml sterilem, destilliertem Wasser gelöst.

2.4 Heterologe Expression

Zur heterologen Expression der erg-Kanäle in den verschiedenen Zelllinien wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Plasmide verwendet. Ein schematischer Vergleich der Proteinstruktur der verwendeten Kanal-Untereinheiten ist in Abbildung 1 dargestellt.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten cDNAs wurden in den pcDNA3 bzw. pcDNA3.1 Vektor kloniert.

Tabelle 1: Verwendete Plasmid und cDNAs

Plasmid/cDNA	relevantes Merkmal / Referenz
PcDNA3 + pcDNA3.1	Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
reg1 (reg 1a)	Bauer et al., 1998
reg1b	Hirdes et al., 2005
reg1a EGFP-tagged	
reg1b DS-Red-tagged	
HERG Δ 2-373	Schönherr et al., 1996
EGFP	enhanced green-fluorescent protein; Fa. Clontech, Heidelberg, Deutschland umklontiert in pcDNA3
DS-Red	Fa. Clontech, Heidelberg, Deutschland umklontiert in pcDNA3
TRH-Rezeptor in pcDNA3.1	UMR cDNA Resource Center Roller, MO USA

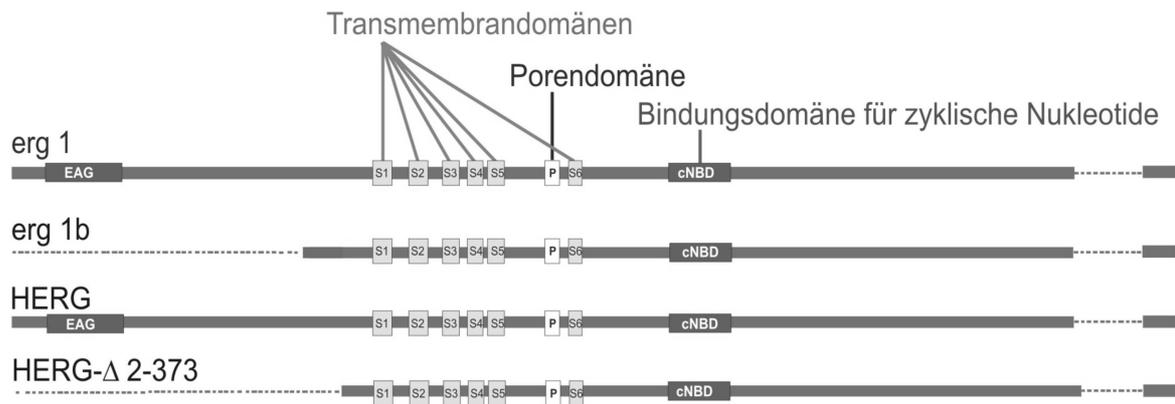


Abbildung 5: Schematischer Vergleich der Proteinstruktur der verschiedenen erg-Kanäle Von oben nach unten werden folgende erg-Kanal-Untereinheiten verglichen: Die erg-Kanaluntereinheiten der Ratte *erg1*, *erg1b*, eine Spleißvariante mit verkürztem N-Terminus, die HERG1-Untereinheit, das menschliche Korrelat von *erg1* und eine Deletionsmutante des HERG ($\Delta 2-373$; N-Terminus)

In der vorliegenden Arbeit wurde u.a. die erg-Kanaluntereinheit der Ratte *erg1* (Acc. nr. Z96106; Bauer et al., 1998) verwendet. Diese entspricht der als *erg1a* definierten Kanaluntereinheit aus der Maus (Acc. nr. AF012868; London et al., 1997), das menschliche Homolog wurde 1994 erstmals bei Warmke & Ganetzky beschrieben. Der *erg1* ist zu 98,7 % homolog und zu 96 % identisch mit dem humanen *erg1* (HERG) (Bauer et al., 1998). Ebenfalls verwendet wurde die Spleißvariante *erg1b*. Dieser fehlt im Vergleich zum *erg1a* der größte Teil des N-Terminus. Im Unterschied zu der in dieser Arbeit ebenfalls eingesetzten Deletionsmutante HERG $\Delta 2-373$ startet *erg1b* von einem Exon, das in *erg1a* nicht enthalten ist. So sind die ersten 36 Aminosäuren von *erg1b* weder im *erg1a* noch in der Deletionsmutante enthalten.

Mikroinjektion

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurde die cDNA der unterschiedlichen Kanäle und ggf. des EGFPs mittels eines Mikroinjektors in die Zellen injiziert. Dieses erfolgte an einem Arbeitsplatz, der mit einem Transjektor 5246 (Eppendorf) sowie einem inversen Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss) ausgestattet war.

Die zu injizierende Plasmidlösung wurde unmittelbar vor dem Benutzen aufgetaut und für 20 min mit 12000 Upm bei 4°C zentrifugiert (Tischzentrifuge 5415 C, Eppendorf). Anschließend wurde die cDNA mit sterilem H₂O auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt. Die Injektion in die Zellen erfolgte mittels sehr feinen, sterilen Glaspipetten (Femtotips, Eppendorf).

Die Zellkulturschälchen wurden in eine im Mikroskopisch befindliche Aussparung gestellt und die auf dem Deckgläschen in der Kulturschale ausgesäten Zellen konnten nun mit dem Femtotip, der zuvor mit der betreffenden cDNA befüllt wurde, injiziert werden. Die Injektionszeit betrug 0,4-0,6 ms bei einem Druck von 80 bis 110 Hektopascal.

Da die verwendeten cDNAs der unterschiedlichen Kanäle individuelle Expressionseigenschaften aufwiesen, wurden die zu injizierenden Konzentrationen variiert.

Die mit EGFP oder DS-Red getaggtten erg1-Kanäle, die aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz nach ihrer Expression in der Zelle zu erkennen waren, wurden ohne zusätzlicher EGFP-cDNA injiziert. Bei den unmarkierten Kanälen wurde 0,01 µg/µl EGFP-cDNA als Injektionsindikator koinjiziert. Da EGFP bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 485 nm eine deutliche grüne Fluoreszenz zeigt, konnten die so injizierten Zellen nach einigen Stunden eindeutig identifiziert werden. Das Messen der Zellen erfolgte 6-24 Stunden nach der Injektion.

Folgende Konzentrationen an cDNA wurden im Femtotip vorgelegt:

Tabelle 2: Konzentrationen der cDNA in der Injektionslösung

CDNA	Konzentration
reg1a	0,01 - 0,02 µg/µl
reg1b	0,01 - 0,05 µg/µl
HERGΔ2-373	0,01 µg/µl
reg1a EGFP-tagged	0,01 - 0,05 µg/µl
reg1b DS-Red-tagged	0,01 - 0,05 µg/µl

2.5 Verwendete Lösungen

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden folgende Lösungen verwendet:

Extrazelluläre Lösungen

5 mM Kalium-Lösung (Angaben in mM):

140 NaCl

5 KCl

2 CaCl₂

2 MgCl₂

10 HEPES

5 Glukose

pH = 7,3 (eingestellt mit 1 M NaOH)

Isotonische KCl-Lösung (Angaben in mM):

140 KCl

4 MgCl₂

1 CaCl₂

10 HEPES

10 Glucose

2,5 EGTA

pH = 7,3 (eingestellt mit 1 M KOH)

Pipettenlösung

Als Pipettenlösung wurde in allen Versuchen folgende Intrazellulärlösung verwendet (Angaben in mM):

140 KCl

2 MgCl₂

1 CaCl₂

2,5 EGTA

10 HEPES

pH = 7,3 (eingestellt mit 1 M KOH)

Für die Perforated-Patch Versuche wurde der Intrazellulärlösung Nystatin in einer Endkonzentration von 0,24 mg/ml zugesetzt.

2.6 Chemikalien

E-4031

E-4031 (Eisai GmbH, D-60528 Frankfurt) ist ein Klasse III-Antiarrhythmikum das, zur Gruppe der Methansulfaniliden gehört. Es handelt sich bei E-4031 um einen hoch spezifischen Blocker für erg-Kanäle. Es wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mM hergestellt und aliquotiert eingefroren. Die Aliquots wurden für die Versuche mit der jeweiligen Extrazellulärlösung verdünnt und in einer Endkonzentration von 10 μ M eingesetzt.

TRH (Thyreotropin Releasing Hormon)

Das TRH wurde als 20 mM Stammlösung mit Aqua Destillata angesetzt und bei -20°C gelagert und für die Versuche unmittelbar vor Durchführung in den Extrazellulärlösungen so verdünnt, dass es nach Applikation in der Messkammer in einer Endkonzentration von 1 μ M vorlag, sofern nicht anders angegeben.

PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat)

PMA wurde mit einer Stammkonzentration von 20 mM bei -20°C gelagert und unmittelbar vor den Versuchen mit der Extrazellulärlösung so verdünnt, dass nach Applikation in der Messkammer eine Endkonzentration von 1-2 μ M vorlag.

Die PMA-haltigen Lösungen und alle benetzten Gegenstände wurden aufgrund der carcinogenen Wirkung von PMA fachgerecht gesammelt und entsorgt.

2.7 Patch-Clamp-Technik

Eine besondere Methode der intrazellulären Ableitung ist die Ganzzell-Konfiguration der Patch-Clamp Technik. Diese ist eine 1976 von Neher und Sakmann entwickelte elektrophysiologische Methode zur Erfassung und Auswertung von transmembranen Strömen und Potentialen an elektrisch erregbaren Membranen (Neher und Sakmann, 1976, 1992; Hamill et al., 1981; Neher, 1992). Mit ihr lassen sich die durch liganden- oder spannungsabhängige Ionenkanäle fließenden Ströme messen. Die Messung erfolgt bei einem konstanten Membranpotential (Voltage-Clamp, Spannungsklemme). Die Methode macht sich die Eigenschaft der Ionenkanäle zunutze, dass ihre Leitfähigkeit bei konstanter Spannung direkt proportional zum Strom ist. Da sich das Membranpotential durch die Aktivität der Ionenkanäle ändert, muss es ständig gemessen und durch Stromimpulse, die denen der Ionenkanäle entgegengesetzt sind, ausgeglichen werden. Anhand der Amplitude der Ausgleichsströme ist die Höhe der über die Membran erfolgten Ladungsverschiebung direkt zu erkennen. Das Besondere der Patch-Clamp Technik besteht darin, dass mit ihr über nur eine Elektrode sowohl das kontinuierliche Messen des Membranpotentials, als auch eine Strominjektion möglich ist. Das ermöglicht das elektrophysiologische Untersuchen von sehr kleinen Somata mit einem Durchmesser der kleiner als 30 μm ist.

Das tatsächliche Membranpotential ist mit dieser Methode jedoch nur bedingt messbar. Durch den Widerstand der Pipette und des Zellzugangs, die in Serie mit der Zellmembran liegen (Serienwiderstand), fällt ein Teil der angelegten Spannung ab. Dadurch kommt es zu einem Fehler in der Spannungsquelle, der nur bedingt korrigiert werden kann. Daher sollte das Verhältnis von Membranwiderstand zu Serienwiderstand möglichst groß sein.

Perforated-Patch

Der größte Teil der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit der Perforated-Patch-Methode durchgeführt (Marty und Finkelstein, 1975; Horn und Marty, 1988). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nur relativ kleine Poren durch das in der Intrazellulärlösung enthaltene Nystatin (s.o.) in der Zellmembran unterhalb der Pipette gebildet werden, durch die die im Zytoplasma enthaltenen Substanzen, wie z.B. Second-Messenger, nicht durch das wesentlich größere Pipettenvolumen ausgewaschen werden können. Durch Verwendung dieser Technik war es möglich, auch über einen längeren Zeitraum hinweg stabile Messungen ohne Verlust oder Reduktion des zu messenden Stroms oder seiner modulierenden Komponenten durchzuführen. Mit den

Messungen wurde begonnen, nachdem der Serienwiderstand einen Wert $\leq 30 \text{ M}\Omega$ erreicht hatte.

2.8 Datenerfassung und Auswertung

Der Messplatz bestand aus einem inversen Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss), das auf einem schwingungsgedämpften Tisch stand. An dessen Objektisch war ein elektronischer Mikromanipulator (Patchman, Eppendorf) befestigt, auf dem der Messelektrodenhalter montiert war. Dieser Aufbau befand sich zur elektrischen Abschirmung innerhalb eines Faraday-Käfigs. Außerhalb des Käfigs befand sich der zu dem Messplatz gehörende Patch-Clamp-Verstärker (EPC-9, HEKA Elektronik), sowie ein PC.

Die Datenerfassung erfolgte mittels der Pulse-Software (HEKA Elektronik). Zur Auswertung und Analyse wurden die Programme PulseFit (HEKA Elektronik), Igor (WaveMetrics, Inc.) und Excel (Microsoft Inc.) verwendet.

Zur Detektion der Fluoreszenz verfügte der Messplatz über eine Fluoreszenzeinrichtung bestehend aus einer Fluoreszenzlampe (HBO 50, Zeiss) und passenden Zeiss Fluoreszenzfiltersätzen für EGFP (Filtersatz 10) und DS-Red (Filtersatz 00).

2.9 Herstellerverzeichnis

Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden

Apple Inc., Cupertino, Kalifornien-USA

BD Bioscience Clontech, D-69126 Heidelberg

Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München

Carl Zeiss Jena GmbH, D-07745 Jena

Eisai GmbH, D-60528 Frankfurt

Eppendorf GmbH, D-22083 Hamburg

GIBCO BRL Life Technology GmbH, D-76131 Karlsruhe

HEKA Electronic, D-66466 Lambrecht

Invitrogen GmbH, D-76131 Karlsruhe

Kendro Laboratory Products GmbH, D- 63505 Langenfeld

Microsoft Inc., Seattle, Washington-USA

Millipore GmbH, D-65824 Schwalbach

Nunc, D-65203 Wiesbaden

Roche Diagnostics GmbH, D-68305 Mannheim

Science Products GmbH, D-65719 Hofheim

Sigma, D-82041 Deisenhofen

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89555 Steinheim

Sutter Instrument Company, Novato-Ca 94949, USA

UMR cDNA Resource Center, 105 Shrenk Hall, 1870 Miner Circle, Rolla, MO 65409 USA

WaveMetrics, Inc. Lake Oswego, Oregon 97035-0032, USA

Zeitz-Instrumente GmbH, D-81377 München

3 Ergebnisse

Die folgenden Versuche zur Modulation der *erg*-Ströme durch TRH und PMA wurden im Perforated-Patch-Modus durchgeführt, um die in der Einleitung beschriebene Signalkaskade nicht zu beeinflussen.

In den meisten Versuchen zur TRH-Modulation der *erg*-Kanäle wurde TRH in einer Konzentration von 1 μM eingesetzt. PMA wurde in einer Konzentration von 1-2 μM eingesetzt. Alle Messungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in 5 mM K^+ -Lösung durchgeführt.

3.1 Modulation von nativen *erg*-Strömen in GH_3/B_6 -Zellen durch TRH

Eine besondere Eigenschaft von *erg*-Kanälen besteht darin, dass es zu einer deutlichen Zunahme ihrer Leitfähigkeit kommt, wenn diese in einer extrazellulären Lösung mit erhöhter Kaliumionenkonzentration $[\text{K}^+]_e$ gemessen werden (Shibasaki, 1987; Lees-Miller et al., 1997; Sturm et al., 2005). Diese Eigenschaft wurde gezielt genutzt, indem der endogene *erg*-Strom von GH_3/B_6 -Zellen in Iso-KCl-Lösung gemessen wurde. Da die endogenen *erg*-Ströme der GH_3/B_6 -Zellen sehr klein sind, wurde dieser in Iso-KCl-Extrazellulärlösung gemessene Strom von anderen endogenen Strömen durch Applikation von E-4031 als E-4031-sensitiver Strom isoliert (Weinsberg et al., 1997) (Abbildung 6 A). Es wurde die dosisabhängige Wirksamkeit von TRH auf die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des endogenen *erg*-Stroms von GH_3/B_6 -Zellen untersucht. Der Effekt der Verschiebung der Spannungsabhängigkeit wurde zuerst beschrieben in Bauer et al., 1990. Er tritt sowohl bei endogenen Strömen als auch bei heterolog überexprimierten *erg*-Kanälen in GH_3/B_6 -Zellen auf (Schledermann et al., 2001).

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurde mit einem Doppel-Puls-Protokoll untersucht. Bei einem Potential von -80 mV zu Beginn des Protokolls sind alle *erg*-Kanäle geschlossen und deaktiviert. Es folgten 5 Sekunden lange depolarisierende Testpulse und anschließend eine Hyperpolarisation auf -100 mV. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurde durch Auftragung der maximalen Amplitude des transienten Einwärtsstroms während des hyperpolarisierenden Pulses gegen die Spannung der vorangegangenen variablen Testpulse bestimmt (Abbildung 6 Ac und B). Die Zunahme im Stromtransienten spiegelt die Erholung von der Inaktivierung wieder, die anschließende Abnahme ist auf die *erg*-Kanal-Deaktivierung zurückzuführen. In Abbildung 6 B ist der normierte *erg*-Strom während des hyperpolarisierenden Pulses vor und nach der

Applikation von 100 nM TRH, gegen die Potentiale der Testpulse aufgetragen. An die dargestellten Datenpunkte wurde eine Boltzmann-Funktion angepasst, und der Wert für die halbmaximale Aktivierung ($V_{0.5}$) des erg-Stroms ermittelt. Nach TRH-Applikation (100 nM) ist $V_{0.5}$ um $\Delta V_{0.5} = 18,3 \pm 2,0$ mV ($n = 4$) von $V_{0.5} = -30 \pm 2,8$ mV auf $V_{0.5} = -11,7 \pm 1,0$ mV zu positiveren Potentialen hin verschoben. Das Balkendiagramm (Abbildung 6 C) zeigt, dass 1 μ M TRH eine ähnlich große Verschiebung verursachte ($\Delta V_{0.5} = 18,7 \pm 1,8$ mV, $n=4$). Bereits eine Konzentration von 10 nM TRH beeinflusste die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, obwohl bei dieser Konzentration von TRH die Verschiebung hin zu positiveren Potentialen deutlich geringer ausfiel ($\Delta V_{0.5} = 10,2 \pm 3,9$ mV, $n=4$). Zudem erfolgte die Reduktion des erg-Stroms bei dieser Konzentration deutlich langsamer und fiel geringer aus als bei 100 nM oder 1 μ M TRH. Bei diesen beiden Konzentrationen war die Reduktion des erg-Stroms innerhalb von ca. drei Minuten nach TRH-Applikation beendet.

Um sicher zu stellen, dass es sich bei den gemessenen endogenen erg-Strömen um Ströme der Spleißvariante erg1a des Kanals handelte, wurden an unserem Institut RT-PCRs von GH₃/B₆-Zellen durchgeführt (Abbildung 6 D). Selbst in der zweiten Runde der Amplifikation konnten keine erg1b-Transkripte nachgewiesen werden, wohingegen erg1a-Transkripte bereits nach der ersten Runde deutlich nachweisbar waren. Gewebe des Rattengehirns diente als Positivkontrolle für erg1a und erg1b.

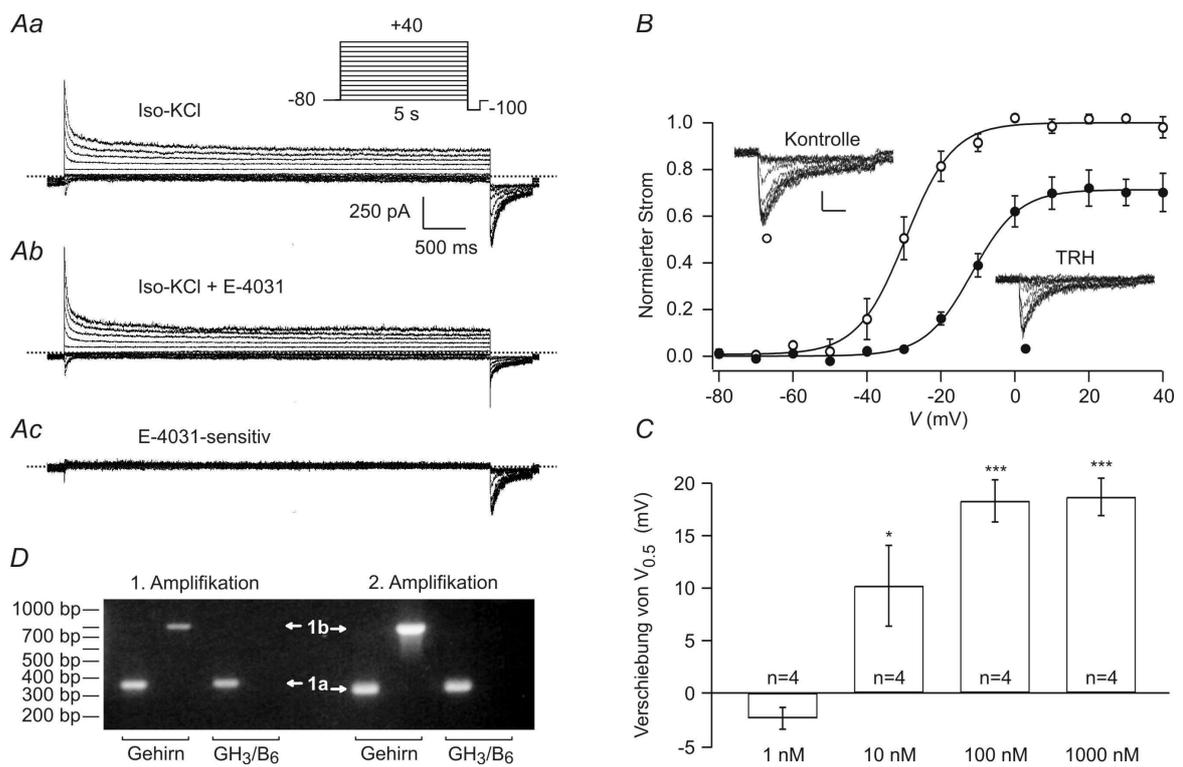


Abbildung 6: Modulation des endogenen GH_3/B_6 -erg-Stroms durch TRH Mittels der Perforated-Patch-Technik aufgenommene Membranströme nativer GH_3/B_6 -Zellen. Von einem Haltepotential von -80 mV aus wurde der erg-Strom mit fünf Sekunden langen, variablen Pulsen von -80 mV bis +40 mV aktiviert. Es folgte ein konstanter hyperpolarisierender Puls auf -100 mV. Der erg-Strom (Ac) wurde als Differenz der Ströme vor (Aa) und nach (Ab) Applikation von 10 μ M E-4031 errechnet. B, gemittelte, normierte Amplituden der erg-Ströme gemessen bei der Hyperpolarisation auf -100 mV, aufgetragen gegen das jeweilige Vorpulspotential vor (\circ) und nach (\bullet) Applikation von 100 nM TRH. An die Datenpunkte ist eine Boltzmann-Funktion angepasst, mit der das Potential der halbmaximalen Aktivierung ($V_{0.5}$) bestimmt wurde. Der Kalibrator der Stromkurven in B entspricht 100 pA und 100 ms. C, Verschiebungen der $V_{0.5}$ -Werte der erg-Ströme, die durch die verschiedenen TRH-Konzentrationen verursacht wurden. Die Anzahl der Versuche ist angegeben, die Balken zeigen Mittelwerte \pm S.E.M., * und *** gibt die Signifikanz der Differenz von $V_{0.5}$ vor und nach TRH-Applikation an mit $P \leq 0,05$ beziehungsweise $P \leq 0,001$ (einseitiger, gepaarter T-Test). D, RT-PCR Amplifikate nach einer und zwei Runden. GH_3/B_6 -Zellen exprimierten erg1a, jedoch nicht erg1b. Als Positivkontrolle wurde Gewebe des Rattengehirns verwendet, in dem beide Spleißvarianten exprimiert werden.

3.2 Modulation des endogenen erg-Stromes in laktotropen Hypophysenprimärkulturzellen der Ratte durch TRH

Es wurde untersucht, ob der beobachtete Effekt von TRH auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, der in den GH₃/B₆- Zellen auftrat, auch bei laktotropen Primärkulturzellen der Rattenhypophyse auftritt. Dazu wurde bei den morphologisch identifizierten laktotropen Zellen der Primärkultur (Corette et al., 1995), wie in 3.1 beschrieben, die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung vor (offene Symbole) und nach (geschlossene Symbole) Applikation von 1 μ M TRH ermittelt (Abbildung 7). Es kam zu einer Verschiebung von $V_{0,5}$ um $\Delta V_{0,5} = 17,1 \pm 2,3$ mV von $V_{0,5} = -23,6 \pm 1,7$ mV vor auf $V_{0,5} = -6,5 \pm 1,7$ mV nach Applikation von TRH ($P \leq 0,0001$; $n=7$). Es kam wie bei den erg-Strömen in GH₃/B₆-Zellen zu einer Reduktion des erg-Strom um ca. 20%.

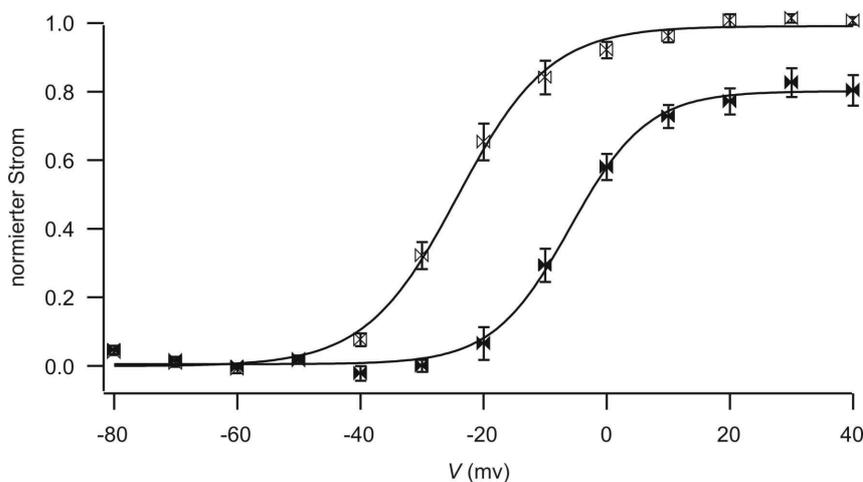


Abbildung 7: Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Hypophysenprimärkulturzellen Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Hypophysenprimärkulturzellen wurde mit dem in 3.1 beschriebenen Protokoll ermittelt. TRH verursachte eine Verschiebung der Aktivierungskurve von $V_{0,5} = -23,6 \pm 1,7$ mV (offene Symbole) auf $V_{0,5} = -6,5 \pm 1,7$ mV nach Applikation von 1 μ M TRH (geschlossene Symbole) um $\Delta V_{0,5} = 17,1 \pm 2,3$ mV ($P \leq 0,0001$, $n=7$).

3.3 Überexpression von *regg*-Kanälen in GH_3/B_6 -Zellen

In Abbildung 8 A sind die verschiedenen überexprimierten *regg*1-Ströme, sowie der endogene *regg*-Strom der GH_3/B_6 -Zellen, gemessen in einer Extrazellulärlösung mit physiologischen 5 mM K^+ , dargestellt. Die *regg*-Ströme wurden durch E-4031 isoliert. Bei dieser niedrigen K^+ -Konzentration waren, wie oben bereits erwähnt, die endogenen Ströme praktisch nicht mehr messbar. In den GH_3/B_6 -Zellen, in die vor den Messungen die cDNA der verschiedenen *regg*-Kanäle injiziert wurde, waren nach 5-8 Stunden *regg*-Ströme mit großer Stromamplitude messbar, die offenbar von heterolog exprimierten Kanälen stammten. Die injizierten Zellen konnten mittels EGFP-Expression identifiziert werden. Dazu wurde die *regg*-cDNA mit EGFP-cDNA koinjiziert oder ein *regg*-EGFP-cDNA-Konstrukt injiziert. Da die Injektion von *regg*1b-cDNA in der selben Konzentration wie *regg*1a cDNA zu einer deutlich kleineren *regg*-Stromamplitude führte, wurde, um einen analysierbaren Strom zu erhalten, *regg*1b-cDNA in dreifach höherer Konzentration injiziert (Abbildung 8 A und B). Es ist nicht bekannt, ob die geringere Stromdichte von *regg*1b durch eine geringere Einzelkanalleitfähigkeit kommt, oder z.B. durch geringere Translation, geringeren Einbau in die Membran (Lees-Miller et al., 1997) oder vermehrten Abbau der Kanalproteine.

Neben der Expression einzelner Untereinheiten wurden auch *regg*1a und *regg*1b koexprimiert, um die Bildung heteromerer *regg*1a/*regg*1b - Kanäle zu untersuchen. Um den prozentualen Anteil der funktionalen homomeren *regg*1b-Kanäle nach Koexpression mit *regg*1a zu untersuchen, wurden die *regg*-Stromamplituden nach Expression von zwei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen der *regg*1a und *regg*1b Kanaluntereinheiten gemessen. Mittels des Aktivierungsprotokolls (siehe Abbildung 6) wurde der Mittelwert des maximalen *regg*-Auswärtsstroms und die maximale Amplitude des Einwärtsstroms nach Repolarisation auf -100 mV bestimmt und in Abbildung 8 B gemeinsam dargestellt. Der im Verhältnis 1:3 WT-*regg*1a/*regg*1b gemessene Einwärtsstrom entsprach der Stromamplitude aus der Summe der beiden einzeln exprimierten Kanäle, allerdings glich die Deaktivierungskinetik dem *regg*1b-Strom. Eine Möglichkeit ist daher, dass es sich um hauptsächlich homomere *regg*1b - Kanaluntereinheiten handelte, die sich aufgrund der deutlich in der Überzahl befindlichen *regg*1b-Kanaluntereinheiten bilden konnten. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Deaktivierungskinetik durch *regg*1b in heteromeren Kanälen dominiert wird. Die Auswärtsstromamplitude war allerdings bei Koinjektion von WT-*regg*1a/*regg*1b (1:3) größer als bei Einzelexpression. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf Bildung von Heteromultimeren sein.

Um zu beweisen, dass die beiden Spleißvarianten heteromere Kanäle bilden, wurde unter

Verwendung der dominant-negativen *reg1aG630S*-Mutante die Verminderung der *reg1b*-Stromamplitude untersucht. Eine Koexpression von *reg1aG630S* mit *reg1b* in einem Verhältnis der cDNAs von 2:1 führte zu drastisch verringerten Stromamplituden. Die durchschnittliche Einwärtsstromamplitude betrug nur noch ca. 5% der Amplitude, die bei den korrespondierenden Verhältnissen WT-*reg1a*/*reg1b* zu messen war, allerdings ist der Anteil der weggefallenen *reg1a*-Homomere an der Stromabnahme unbekannt. Im Verhältnis 1:3 *reg1aG630S* zu *reg1b* wurde immer noch eine Reduktion der Einwärtsstromamplitude auf fast 13% gegenüber den Messungen mit WT-*reg1a*/*reg1b* im gleichen Verhältnis erzielt, es gilt die selbe Einschränkung in Hinblick auf den Wegfall der funktionellen *reg1a*-Kanäle wie in dem vorherigen Vergleich. Gegenüber der Einwärtsstromamplitude von *reg1b* in der selben Konzentration (30ng/ μ l) ohne Koexpression von *reg1aG630S* betrug die Reduktion dagegen nur ca. 47%, ein Hinweis darauf, dass ca. 50% des Stroms durch Heteromultimerbildung mit der dominant-negativen Kanaluntereinheit unterdrückt wurde und die darüber hinausgehende Stromreduktion gegenüber Koexpression von WT-*reg1a*/*reg1b* (1:3) vermutlich auf Wegfall der *reg1*-Homomere zurückzuführen war.

Ebenfalls deutlich erkennbar ist, dass bei *reg1a* die Einwärtsstromamplitude deutlich größer war als der stationäre Auswärtsstrom, wohingegen der Einwärts- und der Auswärtsstrom von *reg1b* nahezu die gleiche Amplitude hatten. Das Verhältnis von Einwärtsstrom bei -100 mV zu maximaler Auswärtsstromamplitude am Ende des Vorpulses kann als Maß für den Einwärtsrektifizierungsfaktor (f) der Kanäle dienen. So wies *reg1b* eine wesentlich größere relative Auswärtsstromamplitude ($f = 1 / 1,08 \pm 0,15$; $n=11$) auf als der *reg1a* ($f = 1 / 0,44 \pm 0,03$; $n=16$; $P \leq 0,0001$). Der relative Auswärtsstrom bei der Koexpression von *reg1a* und *reg1b* im Verhältnis 2:1 ($f = 1 / 0,71 \pm 0,05$; $n=11$, $P \leq 0,0001$) und 1:3 ($f = 1 / 0,87 \pm 0,04$; $n=16$, $P \leq 0,0001$) war signifikant höher als bei der einfachen Expression von *reg1a*.

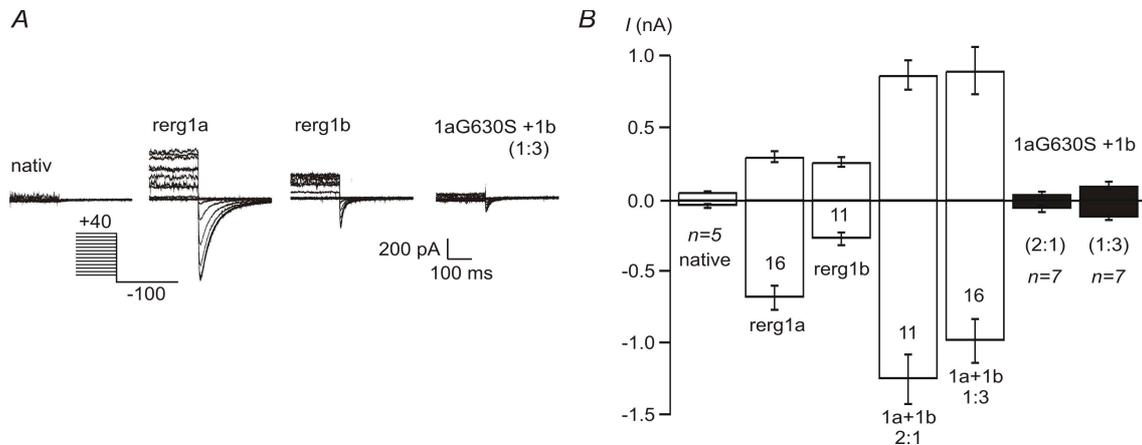


Abbildung 8: Koexprimierte *rearg1a* und *rearg1b* Untereinheiten bilden heteromere *erg*-Kanäle in GH_3/B_6 -Zellen A, E-4031-sensitive Ströme gemessen in 5 mM K^+ -Extrazellulärlösung in nativen Zellen, nach Injektion von cDNA für *rearg1a*, *rearg1b* und nach Koinjektion der dominant negativen *rearg1a*-Mutante *rearg1aG630S* mit *rearg1b*. Die dargestellten Stromkurven entsprechen den Strömen am Ende des 5 s langen Vorpulses und bei der folgenden Hyperpolarisation auf -100 mV. B, Amplituden der Einwärts- und Auswärtsströme in nativen GH_3/B_6 -Zellen und in Zellen gemessen 5-8 Stunden nach Injektion von cDNA kodierend für *rearg1a* (10 ng/ μ l), *rearg1b* (30 ng/ μ l), und *rearg1a* + *rearg1b* in den Verhältnissen 2:1 (20+10 ng/ μ l) und 1:3 (10+30 ng/ μ l). Die schwarzen Balken zeigen die Versuche mit der dominant - negativen Mutante *rearg1aG630S*, die anstelle von WT-*rearg1a* in den selben Verhältnissen wie oben beschrieben, mit *rearg1b* koexprimiert wurde. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm S.E.M. des maximalen *rearg*-Auswärtsstroms und der Stromamplitude nach Repolarisation auf -100 mV.

3.4 Fluoreszenzaufnahmen der EGFP- und DS-Red markierten *regg*-Kanäle

Um die subzelluläre Anordnung der beiden *regg1*-Untereinheiten zu zeigen, wurden cDNA-Konstrukte, die für einen N-terminal EGFP-markierten *regg1a*- und einen DS-Red-markierten *regg1b*-Kanal kodieren, in GH₃/B₆-Zellen injiziert. In den meisten Zellen, die mit cDNA der EGFP-markierte *regg1a*- oder DS-Red-markierte *regg1b*-Kanäle injiziert wurden, war die Verteilung der *regg1a*-Kanäle gleichmäßiger in der Zelle als die der *regg1b*-Kanäle, die häufig dichte Ansammlungen in der Zelle bildeten (Abbildung 9 A und B). Bei einer Koinjektion von *regg1a*- und *regg1b*-cDNA konnte eine überlappende Verteilung beider Kanaluntereinheiten in der Zelle beobachtet werden (Abbildung 9 C und D). In den meisten Fällen kam es zu einer diffusen Verteilung der *regg*-Expression (Abbildung 9 C), doch konnten in einigen injizierten GH₃/B₆-Zellen auch Ballungen der Kanäle beobachtet werden (Abbildung 9 D). Gleiche Effekte traten mit jeweils anders getaggtten Kanälen auf.

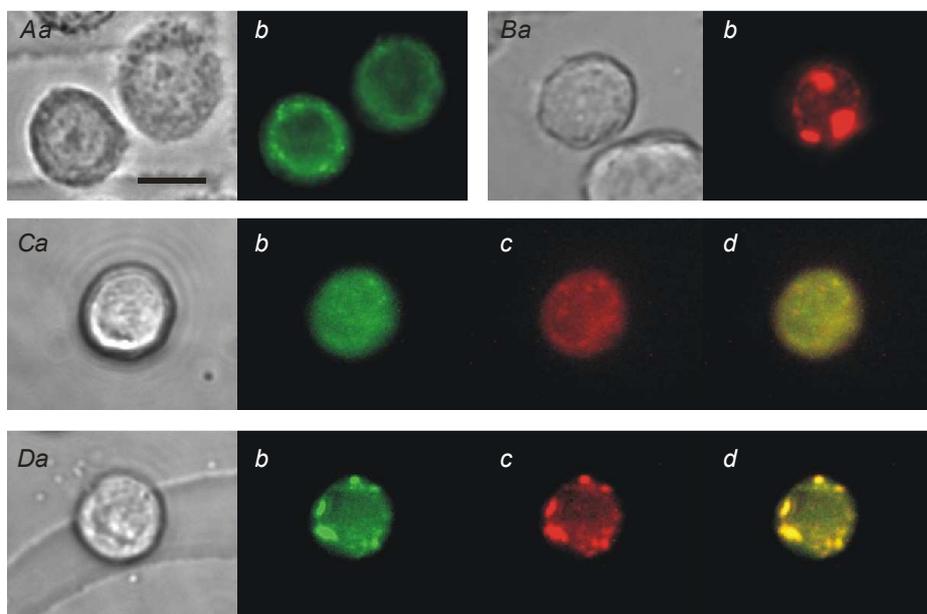


Abbildung 9: Subzelluläre Verteilung der mit EGFP und DS-Red getaggtten *regg*-Kanäle A-D, Hellfeld- (a) und Fluoreszenzaufnahmen (b-c) von GH₃/B₆-Zellen injiziert mit cDNA für *regg1a*-EGFP (10 ng/μl), *regg1b*-DS-Red (30 ng/μl) und *regg1a*-EGFP + *regg1b*-DS-Red im Verhältnis 1:3 (10+30 ng/μl, C und D). Cd und Dd zeigen die überlagerten Aufnahmen der *regg1a*- und *regg1b*-Fluoreszenzen.

3.5 Modulation von überexprimierten *reg1a*- und *reg1b*-Kanälen durch TRH in GH₃/B₆-Zellen

Membranströme von GH₃/B₆-Zellen, in die zuvor cDNA kodierend für *reg1a* oder *reg1b* Kalium-Kanaluntereinheiten injiziert wurden, wurden in 5 mM K⁺ Extrazellulärlösung gemessen. Alle Experimente wurden mit der Perforated-Patch-Technik durchgeführt. Die finale TRH-Konzentration betrug 1 µM, um sicher zustellen, dass eine maximale und möglichst schnelle Aktivierung der Signalkaskade zur Modulation der *reg*-Kanäle ausgelöst wurde. Die selben Versuche wurden ebenfalls mit einer Koexpression von *reg1a* und *reg1b* im Verhältnis 1:3 und 2:1 durchgeführt, um eventuelle schrittweise Veränderungen der TRH-Effekte zu beobachten. Bei allen *reg*-Kombinationen verursachte TRH eine deutliche Reduktion der Einwärts- und Auswärtsströme. Die *reg*-Stromreduktion in GH₃/B₆-Zellen nach TRH-Applikation war normalerweise innerhalb von 3-5 Minuten abgeschlossen. Dies entsprach dem Zeitverlauf, der für die endogenen *erg*-Ströme in GH₃/B₆-Zellen (Bauer et al., 1990) und in laktotropen Zellen der Ratte (Corrette et al., 1996; Schäfer et al., 1999) beschrieben wurde. TRH wurde nicht aus dem Bad ausgewaschen. Es gab keine Hinweise auf eine Reversibilität der beobachteten Effekte während der Versuchsdauer. Um die biophysikalischen Mechanismen für die TRH-induzierte Reduktion des *erg*-Stroms zu untersuchen, wurden verschiedene Pulsprotokolle vor und nach Applikation von TRH aufgenommen. Während der TRH-Applikation wurde ein Testpulsprotokoll in regelmäßigen Intervallen durchgeführt. Nach Abschluss der Experimente wurden die Pulsprotokolle ein drittes Mal durchgeführt, nachdem E-4031 in das Bad appliziert wurde. Dadurch konnte der E-4031-sensitive *erg*-Strom aus dem Gesamtstrom isoliert werden.

3.5.1 TRH-Effekte auf die Aktivierung

Die Beeinflussung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung der *reg1a*- und *reg1b*- Ströme durch TRH wurde mittels fünf Sekunden langen depolarisierende Pulsen, ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV, untersucht (Abbildung 10 A). Die Abnahme der Amplitude des E-4031-sensitiven Stroms am Ende des depolarisierenden Pulses bei positiven Potentialen demonstriert die Einwärtsrektifizierung der *reg*-Kanäle (Abbildung 10 *Ba und b*). Die maximalen Amplituden der Auswärtsströme waren bei den Kontrollen für *reg1a* bei 0 mV und für *reg1b* bei +10 mV. Den variablen Pulsen folgte ein konstanter hyperpolarisierender Puls auf -100 mV, um den Anteil der durch die depolarisierenden Pulse aktivierten Kanäle zu bestimmen. *Reg1a* und *reg1b* zeigten

Unterschiede in der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung ($P \leq 0,0001$). Rerg1a erreichte seine halbmaximale Aktivierung ($V_{0,5}$) bei $-15,8 \pm 1,4$ mV ($n=6$) und rerg1b bei $-4,2 \pm 1,4$ mV. TRH reduzierte die rerg1a- und rerg1b- Auswärtsströme und induzierte eine signifikante Verschiebung der Aktivierungskurve der rerg1a-Kanäle zu positiveren Potentialen (Abbildung 10 Ca). Die mittlere Verschiebung von $V_{0,5}$ betrug bei rerg1a $\Delta V_{0,5} = 10,0 \pm 1,3$ mV ($n=16$; $P \leq 0,0001$). Im Gegensatz dazu kam es beim rerg1b-Strom zu keiner signifikanten Verschiebung ($2,1 \pm 1,4$ mV, $n=14$), jedoch war beim rerg1b-Kanal die Reduktion des maximal verfügbaren Stroms wesentlich ausgeprägter ($47,8 \pm 4,0\%$ Stromreduktion, $P \leq 0,01$) als beim rerg1a-Strom ($31,6 \pm 4,1\%$ Stromreduktion).

Die gleichen Versuche wurden nach Koexpression von rerg1a und rerg1b durchgeführt, wobei ihre cDNA in zwei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen injiziert wurde (2:1 und 1:3). Es wurde festgestellt, dass sich der $V_{0,5}$ -Wert der Aktivierungskurven der koexprimierten rerg1a- und rerg1b-Kanäle ($-15,5 \pm 1,8$ mV, $n=11$ für das Verhältnis 2:1 und $-14,9 \pm 1,8$ mV, $n=14$ für das Verhältnis 1:3) kaum vom $V_{0,5}$ -Wert der rerg1a-Ströme unterschied, jedoch signifikant verschieden war zum $V_{0,5}$ -Wert der rerg1b-Ströme ($P \leq 0,0001$ für beide Konzentrationsverhältnisse). Wie bei den reinen rerg1a- und rerg1b-Strömen, kam es auch bei diesen Experimenten zu einer eindeutigen Reduktion der Auswärtsströme sowie zu einer Abnahme der Stromamplituden bei Hyperpolarisation auf -100 mV (Abbildung 10 Bc, Bd, Cc und Cd). Die Abnahme betrug $37,9 \pm 4,3\%$ (2:1) und $42,9 \pm 4,6\%$ (1:3). Eine kleine Verschiebung der Aktivierungskurve durch TRH zu positiven Potentialen um ca. 5 mV wurde beim rerg1a/rerg1b-cDNA-Verhältnis von 2:1 beobachtet ($\Delta V_{0,5} = 4,6 \pm 1,6$ mV; $P \leq 0,05$; $n=11$), wohingegen bei dem Verhältnis 1:3 keine signifikante Verschiebung erfolgte ($\Delta V_{0,5} = 2,4 \pm 1,3$ mV, $n=14$). Abbildung 10 D verdeutlicht, dass die rerg1b-Untereinheit eine TRH ausgelöste Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung inhibiert, obwohl die Spannungsabhängigkeit selbst vom rerg1a dominiert wurde.

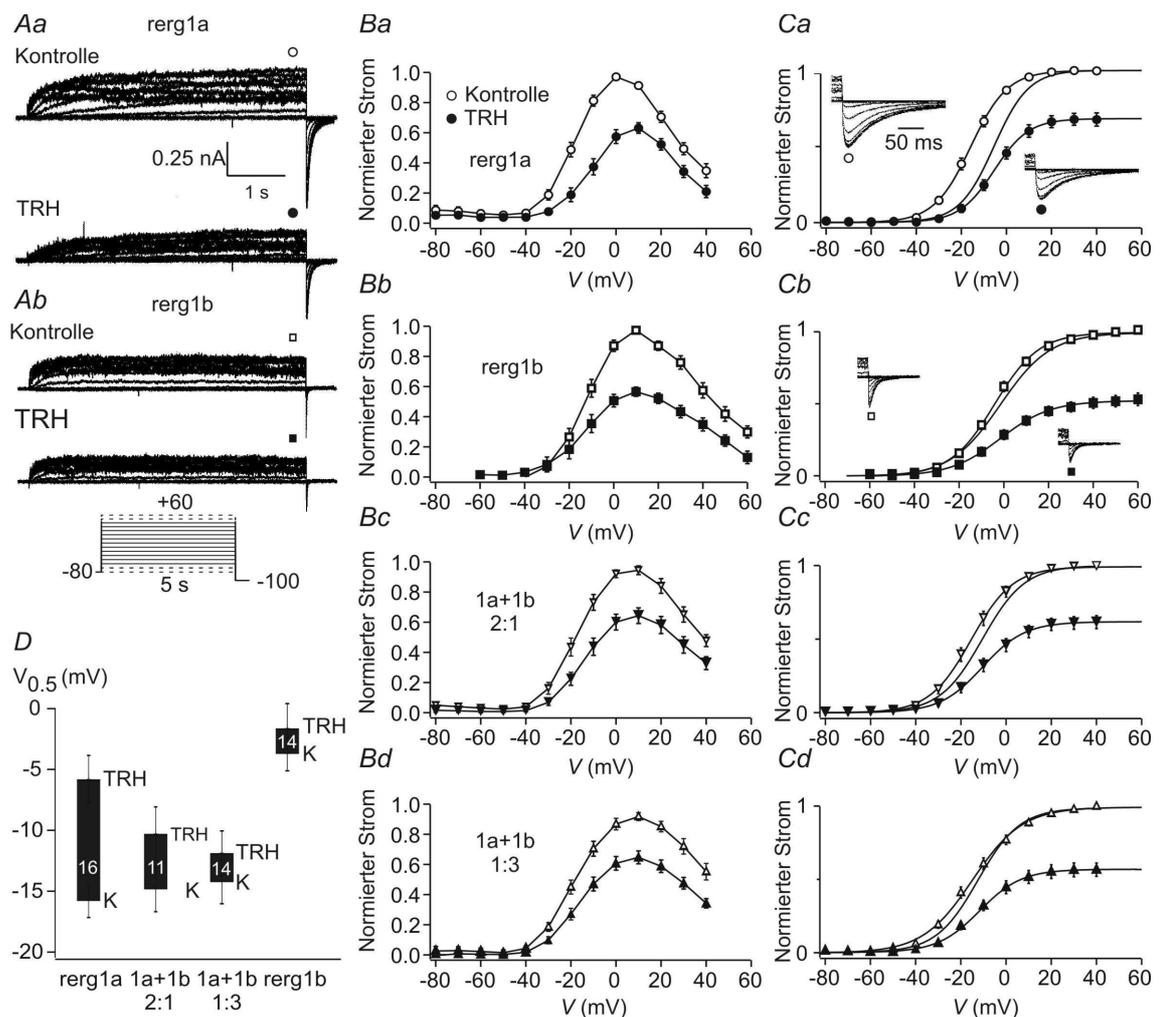


Abbildung 10: Rerg1b inhibiert die TRH-induzierte Verschiebung der erg1 Aktivierungskurven Die Membranströme wurden mittels der Perforated-Patch Whole-Cell Konfiguration vor und nach der Applikation von 1 μ M TRH gemessen. In die GH₃/B₆-Zellen wurde zuvor die cDNA für reg1a (a), reg1b (b) sowie in den Verhältnissen 2:1 (c) und 1:3 (d) reg1a+reg1b injiziert. Die Ströme wurden als E-4031-sensitive Ströme isoliert. A, Rerg1a- (Aa) und reg1b-Ströme (Ab) gemessen mit 5 Sekunden langen, variablen Pulsen ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV, gefolgt von einem Puls auf -100 mV. Die durch den hyperpolarisierenden Puls ausgelösten Einwärtsströme von reg1a und reg1b sind als Einschübe in Ca und Cb dargestellt. In B, sind die gemittelten (\pm S.E.M.) Auswärtsstromamplituden am Ende des 5 s langen Pulses (gemessen an der Stelle der Symbole in A) dargestellt. Die Stromamplituden sind vor (offene Symbole) und nach TRH-Applikation (geschlossene Symbole), normiert auf die Kontrolle, abgebildet. In C ist die maximale erg-Stromamplitude nach Hyperpolarisation auf -100 mV gegen das Vorpulspotential aufgetragen. Die gemittelten regg-Ströme (\pm S.E.M.) sind vor (offene Symbole) und nach TRH-Applikation (geschlossene Symbole) dargestellt. An die Datenpunkte ist eine Boltzmann-Funktion angepasst (durchgezogene Linie). Des weiteren sind auf Eins normierte Boltzmannkurven nach TRH-Applikation dargestellt, um den Effekt von TRH auf die Spannungsabhängigkeit zu verdeutlichen. D, Vergleich der Werte von V_{0.5} vor (K) und nach (TRH) TRH-Applikation. Fehlerbalken \pm S.E.M.

3.5.2 Einfluss von TRH auf die Deaktivierungskinetik der erg-Ströme

Der zeitliche Verlauf der erg-Kanal Deaktivierung wurde mittels der Aktivierungsprotokolle bestimmt. Abbildung 11 A zeigt die schnelle Deaktivierung von *reg1b* im Vergleich zu *reg1a*. Die Zeitkonstante der Deaktivierung (τ_{deact}) wurde mit Hilfe des Einwärtsstroms bei der Repolarisation auf -100 mV des Aktivierungsprotokolls bestimmt, indem eine Exponentialfunktion an den Abschnitt des Einwärtsstroms angepasst wurde, bei dem die Stromamplitude abnimmt. Es wurden in jedem Experiment die Zeitkonstanten für die Einwärtsströme bestimmt, die den variablen Vorpulsen zwischen 40 und 10 mV folgten, weil hier die erg-Kanäle maximal aktiviert waren, und die Werte gemittelt.

Die Koexpression von *reg1a*- und *reg1b*-Kanaluntereinheiten führte zu Mittelwerten von τ_{deact} , die signifikant größer waren als die der homomeren *reg1b*-Kanäle ($P \leq 0,001$, sowohl für das Verhältnis *reg1a* zu *reg1b* 2:1 als auch 1:3). Auch die Werte für die Zeitkonstante der beiden Koexpressionsverhältnisse unterschieden sich signifikant voneinander. Je höher der Anteil von *reg1b* war, desto schneller erfolgte die Deaktivierung.

Die Zeitkonstante der Deaktivierung von *reg1a* wurde nach Applikation von TRH signifikant verkleinert. Dagegen wurde die wesentlich schnellere Deaktivierung von *reg1b* nicht mehr signifikant beeinflusst. Abbildung 11 B zeigt die Zeitkonstante der Deaktivierung vor und nach TRH-Applikation für die verschiedenen Ströme. Die bei den heteromeren erg-Kanälen beobachtete Beschleunigung der Deaktivierung durch TRH (bei beiden um ca. 16%), war weniger stark ausgeprägt als bei *reg1a*-Homomeren.

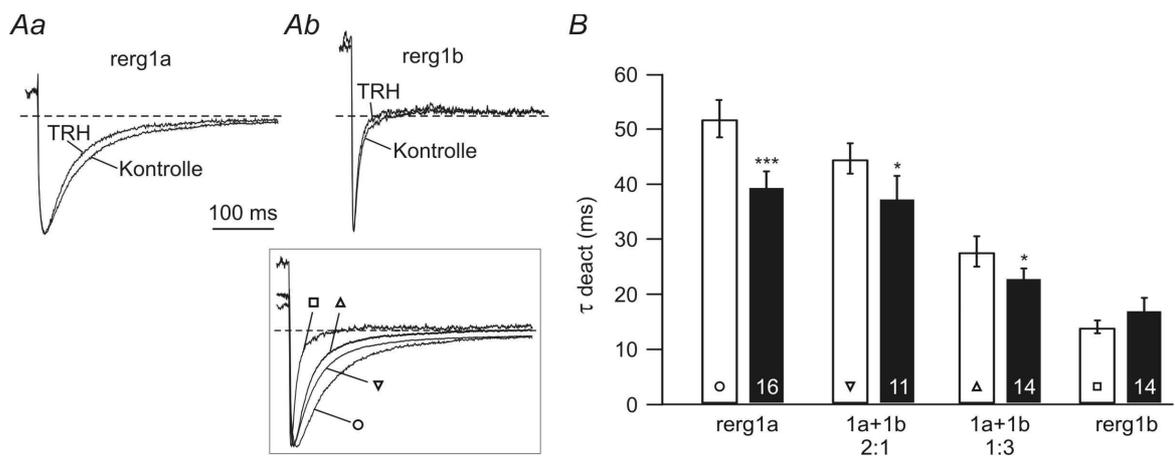


Abbildung 11: Unterschiedliche Effekte von TRH auf die Deaktivierungskinetik A, Überlagerte normierte Stromspuren des selben Experiments vor und nach TRH-Applikation nach einem Vorpuls von 40 mV bei -100 mV. Aa, Deaktivierung der reg1a-Ströme. Ab, Deaktivierung der reg1b-Ströme. Die erg-Ströme wurden mit E-4031 isoliert. B, Durchschnittliche Zeitkonstanten der schnellen Deaktivierung bei -100 mV vor (weiße Balken) und nach (schwarze Balken) TRH-Applikation für die verwendeten homomeren reg1a- und reg1b-Kanäle sowie die heteromeren Kanäle in beiden cDNA Verhältnissen. * und *** geben die Signifikanz der Beschleunigung nach TRH-Applikation an mit $P \leq 0,05$ beziehungsweise $P \leq 0,001$ (einseitiger, gepaarter t-Test). Fehlerbalken \pm S.E.M. Der Einschub zeigt die normierten Kontrollströme und die Symbole markieren die jeweiligen Ströme wie in B.

3.5.3 TRH-Effekte auf die Aktivierungskinetik der verschiedenen erg-Ströme

Der zeitliche Verlauf der erg-Strom Aktivierung wurde mit einem „Envelope-of-Tail“-Protokoll ermittelt (Abbildung 12). Dazu wurden von einem Haltepotential von -80 mV ausgehend depolarisierende Pulse auf +40 mV mit variabler Dauer durchgeführt, denen ein hyperpolarisierender Puls auf -100 mV folgte. Die durch die Hyperpolarisation ausgelöste erg-Stromamplitude wurde mit zunehmender Vorpulsdauer größer. Es wurden die Vorpulszeiten ermittelt, bei denen eine halb-maximale erg-Stromaktivierung erfolgte ($t_{0,5}$, siehe Gomez-Varela et al., 2003a). Homomere *reg1a*- und *reg1b*-Kanäle unterschieden sich in ihren Aktivierungskinetiken. Bei +40 mV aktiviert *reg1b* signifikant und im Mittel 30% schneller ($t_{0,5}$: 116 ± 14 ms, $n=11$) als *reg1a* ($t_{0,5}$: 165 ± 14 ms, $P \leq 0,05$, $n=16$). TRH verursachte eine deutliche Verlangsamung der *reg1a*-Aktivierung von mehr als 90% ($t_{0,5}$ Kontrolle: 165 ± 14 ms, $t_{0,5}$ TRH: 318 ± 25 ms). Dieser Effekt war bei *reg1b* sehr viel geringer ausgeprägt, die Verlangsamung betrug nur 24% ($t_{0,5}$ Kontrolle: 116 ± 14 ms, $t_{0,5}$ TRH: 144 ± 21 ms, $P \leq 0,05$). Bei Koexpression von *reg1a*- und *reg1b*-Kanaluntereinheiten im Verhältnis 2:1 verursachte TRH eine etwas weniger ausgeprägte Verlangsamung der Aktivierung als bei *reg1a* ($t_{0,5}$ Kontrolle: 155 ± 11 ms, $t_{0,5}$ TRH: 238 ± 21 ms) um ca. 55%. Im Vergleich zu *reg1a* konnte hier kein signifikanter Unterschied des TRH-Effektes festgestellt werden. Bei einer Koexpression von *reg1a* und *reg1b* im Verhältnis 1:3 kam es zu *reg1*-Strömen, die ähnlich den *reg1b*-Strömen durch TRH nur geringfügig langsamer aktivierten (um 23%, $t_{0,5}$ Kontrolle: 116 ± 13 ms, $t_{0,5}$ TRH: 143 ± 12 ms, $P = 0,05$; $n=14$).

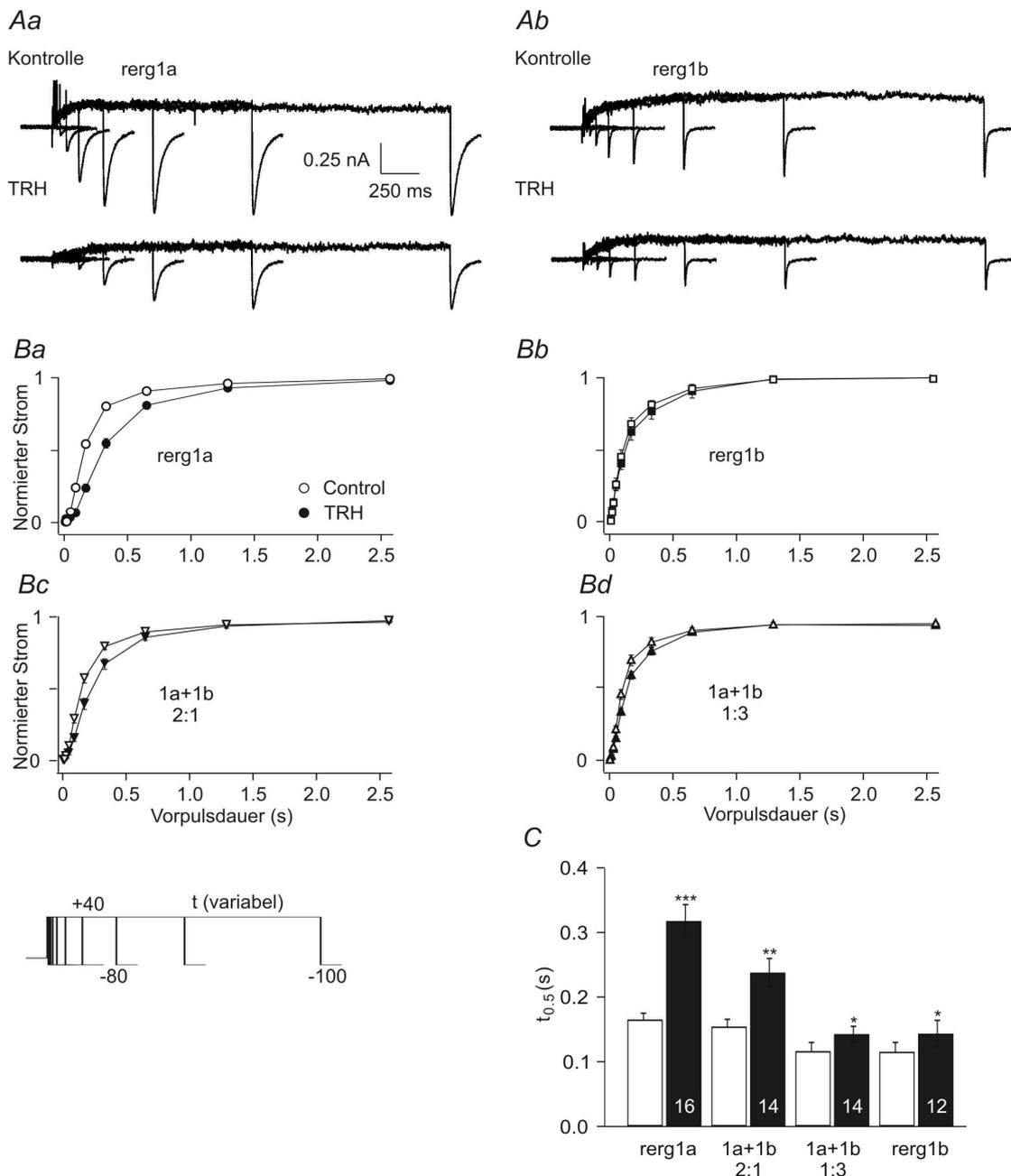


Abbildung 12: Koexpression von rerg1b vermindert die durch TRH verursachte Verlangsamung der rerg-Kanal Aktivierung Der zeitliche Verlauf der erg-Strom Aktivierung wurde vor und nach Applikation von 1 μ M TRH gemessen. A, rerg1a und rerg1b Ströme ausgelöst durch verschieden lange Depolarisationen auf +40 mV, gefolgt von einem hyperpolarisierenden Puls auf -100 mV. Das Haltepotential betrug -80 mV. Die Ströme wurden mit E-4031 isoliert. B, normierte maximale Amplituden des erg-Einwärtsstroms bei Hyperpolarisation, aufgetragen gegen die Dauer des depolarisierenden Pulses, vor (offene Symbole) und nach (geschlossene Symbole) Zugabe von 1 μ M TRH. C, Vergleich der Zeit zum Erreichen der halbmaximalen Aktivierung ($t_{0.5}$) vor (weiße Balken) und nach (schwarze Balken) TRH-Applikation dargestellt als Mittelwerte \pm S.E.M., die Anzahl der Experimente ist angegeben. *, ** und *** geben die Signifikanzen der Unterschiede vor und nach TRH-Applikation mit $P = 0,05$, $P = 0,01$ und $P = 0,001$ an (zweiseitiger, gepaarter t-Test).

3.5.4 Effekte von TRH auf die Inaktivierung und Leitfähigkeit von erg-Strömen

Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung wurde mittels eines Protokolls mit drei Pulsen untersucht („Dreipulsprotokoll“ nach Smith et al., 1996). Einer 500 ms langen Depolarisation auf +80 mV (P1), in der die erg-Kanäle komplett aktiviert und inaktiviert werden, folgte ein 10 ms langer variabler Puls mit Potentialen zwischen +80 und -140 mV (P2). Die durch den anschließenden depolarisierenden Puls auf +40 mV (P3) ausgelöste erg-Stromamplitude wurde genutzt, um den Anteil der Kanäle zu ermitteln, die sich während des P2-Testpotentials von der Inaktivierung erholt hatten. Bei der Auswertung dieser so genannten Inaktivierungskurven wirkte sich störend aus, dass bei zunehmend negativen Testpotentialen von P2 der Strom, der während des P3-Pulses gemessen werden konnte, aufgrund von zunehmender Deaktivierung des erg-Stroms während des P2-Pulses abnahm. Dieser Effekt war bei dem sehr viel schneller deaktivierenden *reg1b*-Strom am ausgeprägtesten (Abbildung 13 *Ab* und *Bb*). Um die deaktivierungsbedingte Reduktion der Inaktivierungskurven aus den Auswertungen abzugrenzen, wurden sigmoidale Funktionen über die betreffenden Datenpunkte angepasst, bei denen noch keine Deaktivierung auftrat. Die Rohdaten wurden zunächst auf die jeweilige maximale Stromamplitude normiert. An die Mittelwertskurven wurden Boltzmannfunktionen angepasst und anschließend auf das extrapolierte Maximum normiert. Die Maxima der Inaktivierungskurven nach TRH-Applikation wurden relativ zu den Kontrollmessungen normiert.

Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierungskurve für den *reg1b*-Strom ($V_{0,5} = -16,2$ mV, $n=8$; Abbildung 13*B*) lag bei wesentlich positiveren Potentialen als die des *reg1a* ($V_{0,5} = -73,7$ mV; Abbildung 13*A*). Bei einer Koexpression von *reg1a* mit *reg1b* im Verhältnis 1:3 entstand ein erg-Strom, dessen Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung ($V_{0,5}$ von -34,1 mV, $n=6$) näher an der des *reg1b* lag, als an der des *reg1a*. TRH verursachte keine signifikante Verschiebung der Inaktivierungskurven ($V_{0,5}$ nach TRH für *reg1a*: -68,4 mV, $V_{0,5}$ für *reg1b*: -11,9 mV und -34,7 mV für *reg1a+1b*).

Es wurde auch der Einfluss von TRH auf den so genannten „Window-Current“ der beiden homomeren erg-Ströme und des *reg1a/reg1b*-Stroms untersucht. Der „Window-Current“, ist ein stationärer Strom, der in einem Spannungsbereich auftritt, bei dem mehr oder weniger Kanäle geöffnet aber noch nicht vollständig inaktiviert sind. Dazu wurden ebenfalls die Aktivierungskurven vor und nach TRH-Applikation (wie in Abbildung 10 beschrieben) zu den jeweiligen Experimenten zur Inaktivierung gemessen. Die gemittelten $V_{0,5}$ -Werte der Aktivierungskurven vor und nach TRH lagen für *reg1a* bei -17,0 mV und

-8,3 mV, für *reg1b* bei -5,2 mV und -8,3 mV, für *reg1a+1b* (1:3) bei -18,4 mV und -15,9 mV. Die Aktivierungskurven sind in der Abbildung 13B als separate Linien dargestellt. Die stationäre Leitfähigkeit wurde berechnet durch Multiplikation der normierten Aktivierungskurven mit den Inaktivierungskurven (Abbildung 13C). Über den gesamten Spannungsbereich positiv von ca. -80 mV war die stationäre Leitfähigkeit für *reg1b* (maximal ca. 0,25) wesentlich größer als für *reg1a* (maximal ca. 0,2). Dieser Unterschied war bei depolarisierenden Spannungen besonders ausgeprägt. Die maximale stationäre Leitfähigkeit lag für *reg1b* bei einer positiveren Spannung als für *reg1a*. Die *reg1a/reg1b*-Ströme verhielten sich intermediär.

Obwohl TRH eine deutliche Reduktion der Leitfähigkeiten aller getesteten *reg*-Kanäle verursachte, trat dieses am deutlichsten bei *reg1a*-Kanälen im Spannungsbereich zwischen -50 und 0 mV auf. Dieses war bedingt durch die von TRH verursachte Verschiebung der *reg1a*-Aktivierung zu positiveren Potentialen.

Um herauszufinden, ob der durch die Perforated-Patch-Methode bedingte relativ hohe Serienwiderstand die mit dem schnellen Dreipulsprotokoll gemessene Inaktivierung wesentlich beeinflusst, wurden einige ergänzende Versuche im konventionellen Whole-Cell Modus durchgeführt. Dieser ermöglicht einen niedrigeren Serienwiderstand und eine höhere Serienwiderstandkompensation. Bei diesen Experimenten betrugen die Werte für die halbmaximale stationären Inaktivierung -85,7 mV (*reg1a*, $n=3$), -22,8 mV (*reg1b*, $n=3$) und -37,9 mV (*reg1a/1b* im Verhältnis 1:3, $n=2$). Diese Werte waren 12,0 mV (*reg1a*), 6,6 mV (*reg1b*) bzw. 3,9 mV (*reg1a/reg1b* 1:3) negativer als die im Perforated-Patch-Modus erhobenen Daten, allerdings mit den selben Differenzen zwischen den *reg1*-Spleißvarianten. Die $V_{0,5}$ -Werte der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung ergaben ebenfalls Unterschiede zu den Versuchen im Perforated-Patch-Modus wobei die Werte 8-11 mV negativer waren.

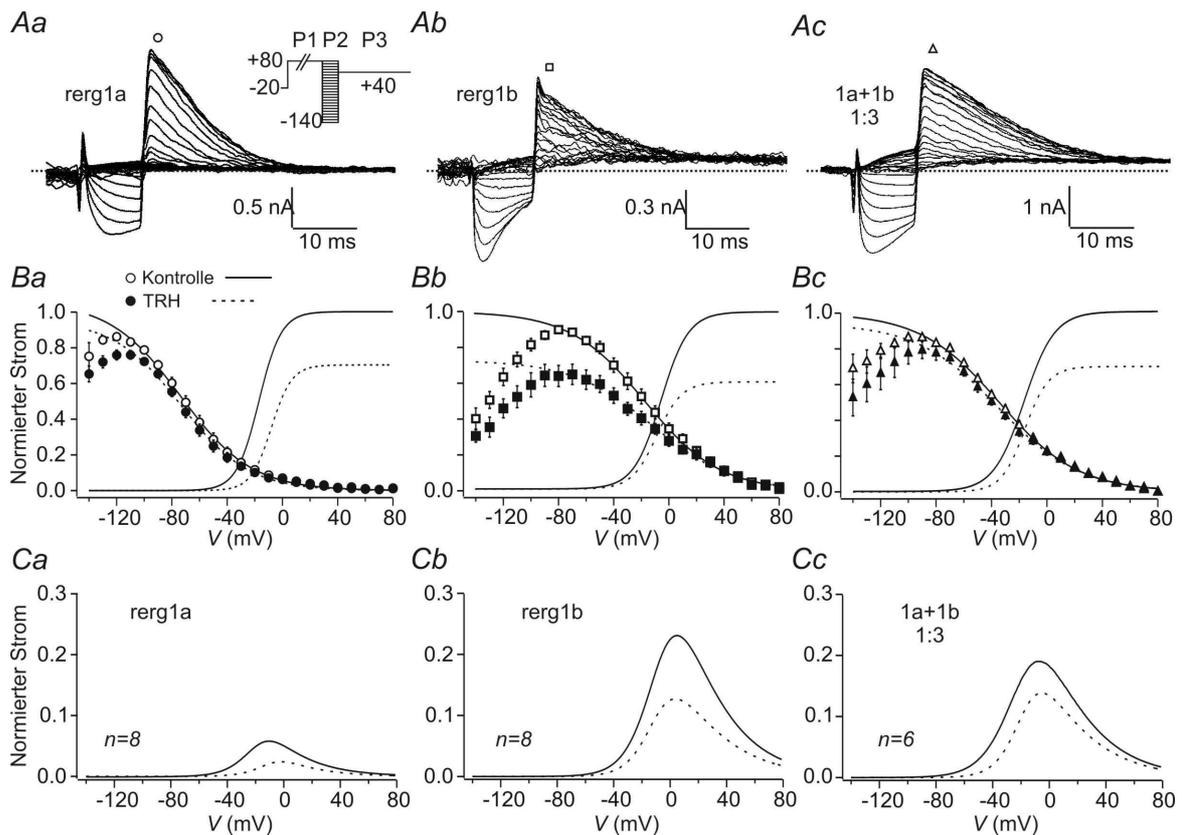


Abbildung 13: TRH verringert den reg1 Auswärtsstrom ohne die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu verändern E-4031-sensitive Ströme wurden in GH₃/B₆-Zellen gemessen, in die zuvor cDNA für reg1a (Aa), reg1b (Ab) und reg1a+reg1b im Verhältnis 1:3 (Ac) injiziert wurde. Einem Vorpuls von 500 ms Länge auf +80 mV (P1) zum vollständigen Aktivieren und Inaktivieren der Kanäle folgte ein variabler Puls von 10 ms Länge zwischen +80 und -140 mV (P2). Zuletzt wurde für 200 ms auf +40 mV depolarisiert (P3), um instantane erg-Auswärtsströme zu erhalten. Das Haltepotential betrug -20 mV. Die Auswärtsstromamplitude spiegelt die Menge der nach dem P2-Puls verfügbaren erg-Kanäle wider. Die Inaktivierungskurven wurden gegen die Spannung von P2 aufgetragen, mit einer Boltzmannfunktion beschrieben und auf die maximalen Stromamplituden der Kontrollen hin normiert. Dabei wurden die Datenpunkte außer Acht gelassen, die durch Deaktivierung beeinflusst waren. B, Inaktivierungskurven vor (offene Symbole) und nach (geschlossene Symbole) Applikation von TRH für reg1a (Ba), reg1b (Bb) und reg1a + reg1b (Bc). Die durchgezogenen Linien stellen die Kontrollen dar, die gestrichelten Linien die Messungen nach Applikation von TRH. C, Spannungsabhängigkeit der stationären erg-Leitfähigkeit vor (durchgezogene Linien) und nach (gestrichelte Linien) Applikation von TRH. Die Kurven wurden durch Multiplikation der Aktivierungskurven mit den Inaktivierungskurven aus B errechnet.

3.6 Vergleich der biophysikalischen Eigenschaften von homomeren und heteromeren erg1-Kanälen in CHO-Zellen

Vergleichend zu den Experimenten in GH₃/B₆-Zellen wurden die biophysikalischen Eigenschaften von rerg1a- und rerg1b-Kanälen sowie von heteromeren rerg1a/1b-Kanälen im Untereinheitenverhältnis 1:3 in CHO-Zellen untersucht. Bei diesen Experimenten wurde aufgrund des fehlenden TRH-Rezeptors auf den Einsatz von TRH verzichtet. Daher konnten die CHO-Zellen im konventionellen Whole-Cell Modus gemessen werden, da das Auswaschen von intrazellulären Signalmolekülen aus der Zelle in Kauf genommen werden konnte.

Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von rerg1a- und rerg1b-Strömen in CHO-Zellen

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung der rerg1-Kanäle wurde mit dem in Abschnitt 3.1 beschriebenen Protokoll untersucht. Da CHO-Zellen über nahezu keine endogenen Ionenkanäle verfügen, wurde der hier heterolog exprimierte erg1-Strom nicht mit E-4031 isoliert.

Wie bereits bei den in GH₃/B₆-Zellen durchgeführten Experimenten unterschieden sich auch in den CHO-Zellen die halbmaximale Aktivierung von rerg1a ($V_{0,5} = -22,5 \pm 1,9$ mV, $n=10$) und rerg1b ($V_{0,5} = -12,6 \pm 1,0$ mV, $n=9$) signifikant voneinander ($P \leq 0,001$).

Die Koexpression von rerg1a- und rerg1b-cDNA im Verhältnis 1:3 führte auch hier zu einem heteromeren rerg1-Strom mit einem ausgeprägten stationären Auswärtsstrom (Abbildung 14 Ac). Entsprechend der Experimente in GH₃/B₆-Zellen lag auch in den CHO-Zellen der $V_{0,5}$ -Wert für den heteromeren erg1-Strom ($V_{0,5} = -22,8 \pm 0,8$ mV, $n=9$) nahe am $V_{0,5}$ -Wert des homomeren rerg1a-Kanals ($V_{0,5} = -22,8 \pm 1,9$ mV, $n=10$) und unterschied sich somit ebenfalls signifikant vom $V_{0,5}$ -Wert des rerg1b ($P \leq 0,001$). Einen kleinen, aber signifikanten Unterschied konnte man bei den Steigungsfaktor K der verschiedenen Aktivierungskurven feststellen. Sie betrug für rerg1a $K = 7,1 \pm 0,1$ mV und für rerg1b $K = 8,7 \pm 0,3$ mV ($P \leq 0,001$). Für die koexprimierten rerg1a/b Untereinheiten betrug sie $K = 7,1 \pm 0,4$ mV ($P \leq 0,01$). Die unterschiedlichen Aktivierungskurven sind in Abbildung 14 B dargestellt.

Deaktivierungskinetik von erg-Strömen in CHO-Zellen

Die Deaktivierungskinetik wurde wie in 3.4.2 bestimmt. Auch bei diesen Messungen erfolgte die Deaktivierung des *reg1b*-Stroms deutlich schneller als die des *reg1a*-Stroms. Die Deaktivierungsgeschwindigkeit des heteromeren *reg1a/reg1b*-Stroms lag auch hier zwischen denen der beiden homomeren Kanäle. In Abbildung 14 C sind die verschiedenen Deaktivierungsverläufe normiert und überlagernd dargestellt. Die Zeitkonstanten der Deaktivierung sind im Balkendiagramm Abbildung 14 C dargestellt. τ_{deact} für den koexprimierten *reg1a/reg1b* - Strom ist signifikant schneller ($P \leq 0,0001$) als τ_{deact} für *reg1a*, und ebenfalls signifikant langsamer als τ_{deact} von *reg1b* ($P \leq 0,0001$).

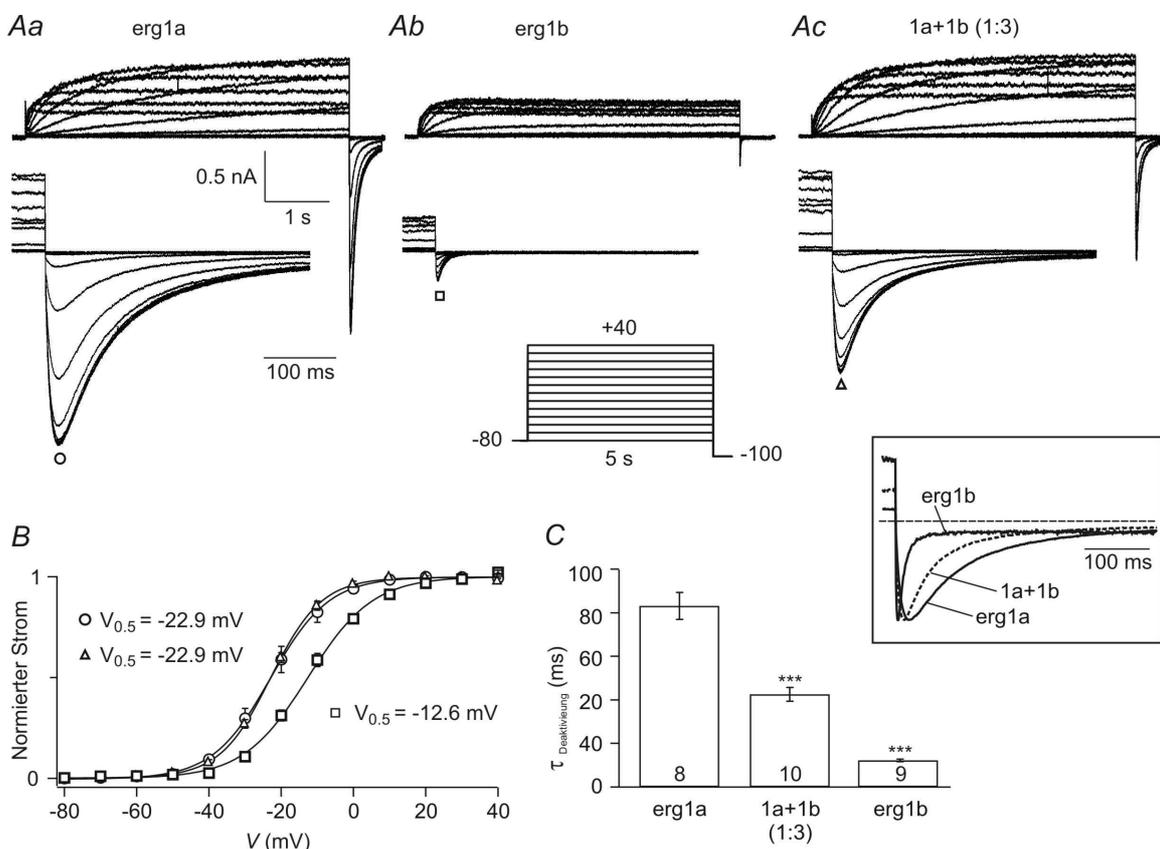


Abbildung 14: *reg1a* dominiert die Spannungsabhängigkeit der erg-Aktivierung bei *reg1a/reg1b* Koexpression in CHO-Zellen A, Membranströme gemessen in CHO-Zellen nachdem in diese cDNA für *reg1a* (Aa) *reg1b* (Ab) und *reg1a/1b* im Verhältnis 1:3 injiziert worden ist. B, Normierter Strom aufgetragen gegen das Vorpulspotential. $V_{0.5}$ -Werte für *reg1a* (○), *reg1b* (□), *reg1a/1b* 1:3 (△). C, Vergleich der Zeitkonstanten der Deaktivierung bei -100 mV. Der Einschub zeigt die gleich groß skalierten Einwärtsströme. Die Anzahl der Experimente ist angegeben, Fehlerbalken entsprechen S.E.M. *** gibt die Signifikanz der Unterschiede zu *reg1a* mit $P = 0,001$ an (zweiseitiger, ungepaarter t-Test).

Inaktivierungseigenschaften von erg-Strömen in CHO-Zellen

Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung wurde mit dem in 3.5.4 beschriebenen Protokoll gemessen. Entsprechend der heterologen Expression in GH₃/B₆-Zellen, lagen die $V_{0,5}$ -Werte von *reg1a*- und *reg1b*-Strömen in den CHO-Zellen weit auseinander ($V_{0,5} \text{reg1a} = -96,7 \pm 2,1 \text{ mV}$, $n=15$ und $V_{0,5} \text{reg1b} = -49,9 \pm 3,8 \text{ mV}$, $n=11$). Die Koexpression von *reg1a* und *reg1b* führte auch hier zu Strömen, deren Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zwischen denen von *reg1a* und *reg1b* lagen ($V_{0,5} \text{reg1a/b} = -77,6 \pm 2,1 \text{ mV}$, $n=9$).

Bei den Versuchen mit CHO-Zellen wurden ebenfalls die stationären Leitfähigkeiten berechnet. Dazu wurden, wie im Abschnitt 3.5.4 beschrieben, die ermittelten Daten aus den Aktivierungskurven mit denen aus den Inaktivierungskurven multipliziert. Hier war ebenfalls der *reg1b*-Strom am größten, insbesondere bei depolarisierenden Potentialen. Dieses zeigte sich deutlich in den Amplituden der stationären Leitfähigkeit, die 0,013 bei -10,4 mV für *reg1a* und 0,116 bei 2,6 mV für *reg1b* betragen. Die maximale Amplitude für *reg1a/1b* lag zwischen diesen Werten mit 0,062 bei -14,0 mV.

Die Zeitkonstante der Inaktivierung wurden mit einem alternativen Protokoll zu dem im Abschnitt 3.5.4 beschriebenen „Dreipulsprotokoll“ gemessen (nach Wang et al., 1997). Hierbei folgte auf einen 2 s langen Puls bei +40 mV, bei dem die *erg*-Kanäle vollständig aktiviert wurden, eine kurze Hyperpolarisation von 10 ms auf ein konstantes Potential. Dadurch wurde die Inaktivierung der im vorangegangenen Puls aktivierten Kanäle aufgehoben. Nun folgten variable depolarisierende Pulse, während derer der Strom aufgrund der spannungsabhängigen Eigenschaften der Kanäle abnimmt (Abbildung 15A). Die abfallende Flanke wurde mit einer exponentiellen Funktion beschrieben, aus der die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierungszeitkonstanten ermittelt werden konnte (Abbildung 15B). Die Kinetik der Inaktivierung der verschiedenen *reg1*-Kanäle unterschied sich bei depolarisierenden Potentialen von -10 mV bis +80 mV nicht signifikant voneinander. Allen gemein war eine Beschleunigung der Inaktivierungskinetik bei höheren Potentialen. Bei Potentialen negativ von -10 mV deaktivierte der *reg1b*-Kanal teilweise, und diese schnelle Deaktivierung vermischte sich mit der Inaktivierung des Kanals, so dass es zum Abknicken der Kurve kam.

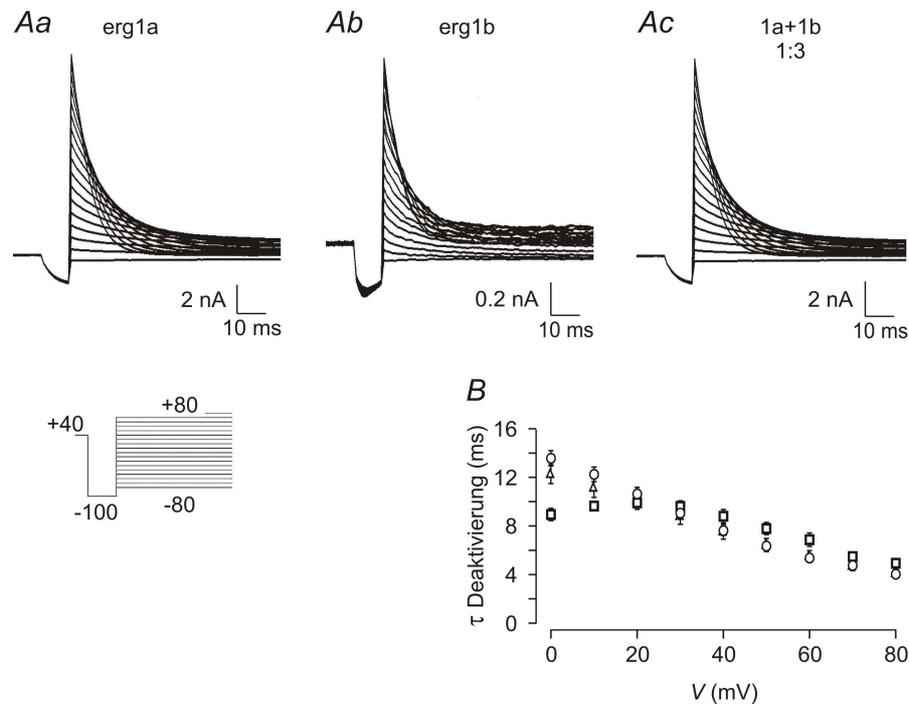


Abbildung 15: Rerg1a, Rerg1b und heteromere Rerg1a/1b Kanäle besitzen ähnliche Inaktivierungskinetiken Membranströme wurden in CHO-Zellen gemessen, in die zuvor cDNA für Rerg1a (Aa), Rerg1b (Ab) oder Rerg1a/Rerg1b (Ac) im Verhältnis 1:3 injiziert wurde. Das Haltepotential betrug -20 mV. Ein zwei Sekunden langer Vorpuls von +40 mV ging den Messungen voraus, um die Rerg-Kanäle zu aktivieren. Ein 10 ms langer Puls von -100 mV wurde genutzt, um die Inaktivierung der Kanäle aufzuheben. Die Zeitkonstante der Stromabnahme während des folgenden variablen Testpulses wurde mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben. B, Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten der Inaktivierung (Mittelwerte \pm S.E.M.) für Rerg1a (○), Rerg1b (□) und Rerg1a/Rerg1b (△).

3.7 PMA-induzierte Effekte auf erg-Kanäle

Der Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) wurde oft als pharmakologischer Aktivator der Proteinkinase C beschrieben. Die Wirkung von PMA auf den erg-Strom ähnelt in einigen Zelltypen der von TRH (Schledermann et al., 2001). In diesen Versuchen wurde nun die Wirkung von PMA mit der von TRH auf heterolog exprimierte erg1-Kanäle verglichen. Als Expressionssysteme dienten neben den bereits verwendeten GH₃/B₆- und CHO-Zelllinien auch die laktotrope MMQ-Zelllinie. Die beiden letzteren besitzen keinen endogenen TRH-Rezeptor.

Zusätzlich zu der cDNA der *reg1*-Kanäle wurde in einigen Experimenten noch cDNA für den TRH-Rezeptor koexprimiert. So sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit eines funktionellen TRH-Rezeptors die durch PMA verursachte Modulation des *reg1*-Stroms beeinflusst.

Zum Vergleich der Effekte von PMA und TRH wurden die bereits beschriebenen Versuche zur Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Zeitabhängigkeit der Aktivierung mit den verschiedenen *reg1*-Kanälen durchgeführt. PMA wurde in die Messkammer appliziert, und lag in einer Endkonzentration von 1-2 μM vor.

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurde mit dem bereits im Abschnitt 3.1 beschriebenen Protokoll gemessen. Nach Durchführung der Messungen wurden die *reg1*-Kanäle durch Zugabe von E-4031 blockiert. Die Auswertung erfolgte mit den durch Subtraktion isolierten E-4031-sensitiven Strömen.

Da TRH in GH₃/B₆-Zellen die Aktivierungskinetik der endogenen und der heterolog exprimierten *reg1a*-Ströme verlangsamt (siehe Abbildung 7), wurde untersucht, ob dieser Effekt auch mit PMA in GH₃/B₆-, MMQ- und CHO-Zellen herbeizuführen ist. Dazu wurden neben den Messungen der endogenen *reg*-Ströme auch verschiedene *reg1*-Kanäle in diesen Zellen heterolog exprimiert.

Zusätzlich zu den bisher untersuchten Kanaluntereinheiten wurde noch eine Deletionsmutante der menschlichen Variante von *reg1a*, HERG1a, verwendet, bei der ein Abschnitt des N-Terminus zwischen Aminosäure 2 und 373 herausgeschnitten wurde (HERG Δ 2-373). Diese besitzt dadurch ähnlich *reg1b* einen stark verkürzten N-Terminus, dem u.a. die PAS-Domäne fehlt.

3.7.1 Einfluss von PMA auf erg-Kanäle in GH₃/B₆-Zellen

Einfluss von PMA auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

PMA verursachte wie TRH bei den in Iso-KCl-Lösung gemessenen endogenen erg-Strömen der GH₃/B₆-Zellen (s. Abschnitt 3.1, Abbildung 1) eine deutliche Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu positiveren Potentialen. So wurde die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von $V_{0,5} = -34,0 \pm 1,1$ mV (Abbildung 16 A, offene Symbole) nach PMA-Applikation auf $V_{0,5} = -19,4 \pm 1,5$ mV um durchschnittlich $\Delta V_{0,5} = 14,5 \pm 1,5$ mV zu positiveren Potentialen verschoben ($P = 0,001$; $n=7$). Außerdem wurde der maximal verfügbare Strom um ca. 20% reduziert. Bei den in GH₃/B₆-Zellen heterolog exprimierten *reg1a*-Kanälen kam es ebenfalls nach Zugabe von PMA zu einer signifikanten Verschiebung der Aktivierung. Der $V_{0,5}$ -Wert der Kontrolle (vor PMA-Applikation) lag bei $-20,8 \pm 2,0$ mV, und damit mehr als 10 mV weiter zu positiveren Potentialen verschoben als der $V_{0,5}$ -Wert der endogenen Kanäle. Der $V_{0,5}$ -Wert nach PMA-Zugabe lag bei $-2,3 \pm 1,1$ mV ($n=7$), es kam zu einer Verschiebung um $\Delta V_{0,5} = 18,6 \pm 2,3$ mV ($P = 0,0001$). Die *reg1a*-Ströme aus koexprimierten *reg1a*- und *reg1b*-Untereinheiten in einem Verhältnis von 2:1 wiesen ebenfalls eine PMA - bedingte Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung auf ($V_{0,5}$ Kontrolle = $-20,8 \pm 1,8$ mV, $V_{0,5}$ PMA = $-11,3 \pm 1,6$ mV; $P = 0,001$, $n=8$), diese war jedoch wesentlich weniger stark ausgeprägt ($\Delta V_{0,5} = 9,4 \pm 1,5$ mV) als bei den endogenen Strömen oder den überexprimierten *reg1a*-Strömen. Bei *reg1b* ($V_{0,5} = -2,8 \pm 1,3$ mV) und der HERG1a-Deletionsmutante ($V_{0,5} = -6,7 \pm 3,4$ mV) konnte PMA keine signifikante Veränderung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung auslösen (Abbildung 15 B; *reg1b*: $\Delta V_{0,5} = 0,3 \pm 1,2$ mV; HERG Δ 2-373: $\Delta V_{0,5} = 4,5 \pm 3,4$ mV). Der $V_{0,5}$ -Wert betrug nach PMA-Applikation $-2,5 \pm 1,2$ mV für *reg1b* und $-2,2 \pm 1,9$ mV für HERG Δ 2-373.

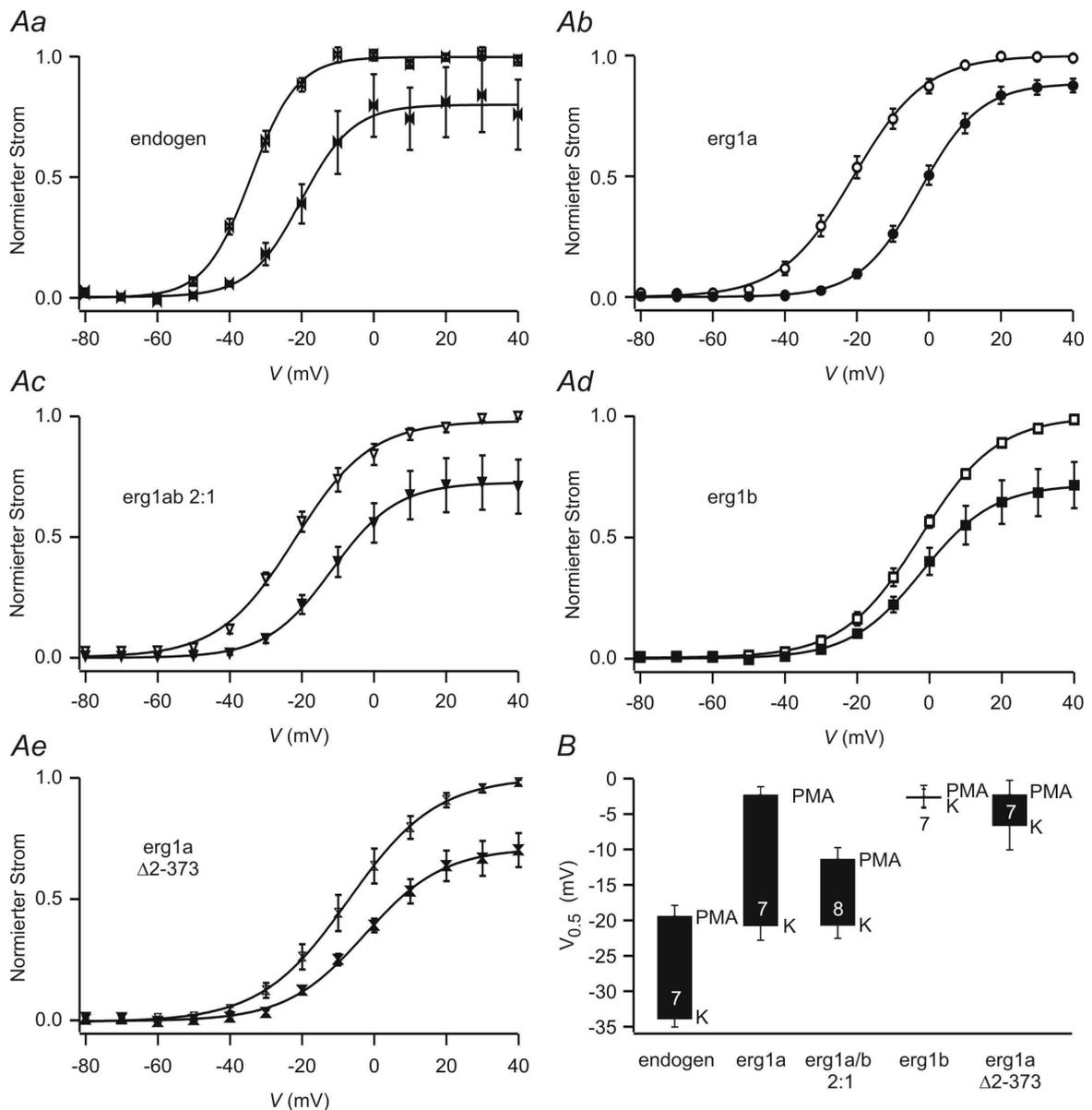


Abbildung 16: Einfluss von PMA auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von erg-Strömen in GH_3/B_6 -Zellen A, Aktivierungskurven verschiedener erg-Kanäle exprimiert in GH_3/B_6 -Zellen vor (offene Symbole) und nach (geschlossene Symbole) Applikation von PMA. Aa, Aktivierungskurven endogener erg1-Ströme der GH_3/B_6 -Zellen gemessen in Iso-KCl-Lösung. Ab-Ae, 5 mM K^+ -Lösung. Ab, Aktivierungskurven der heterolog exprimierten reg1a-Kanäle. Ac, Aktivierungskurven der heterolog im Verhältnis 2:1 exprimierten heteromeren reg1a/b-Kanäle. Ad, Aktivierungskurven des reg1b-Stroms. Ae, Aktivierungskurven der Deletionsmutante erg1 Δ 2-373. Die jeweiligen $V_{0.5}$ sind dem Text zu entnehmen. B, Vergleich der durch PMA induzierten Verschiebung von $V_{0.5}$ vor (K) und nach (PMA) PMA-Applikation. PMA verschiebt die Aktivierungskurve der endogenen Ströme ($\Delta V_{0.5} = 14,6 \pm 1,5$ mV), des reg1a-Stroms ($\Delta V_{0.5} = 18,6 \pm 2,3$ mV) und die des reg1a/b-Stroms ($\Delta V_{0.5} = 9,4 \pm 1,5$ mV) deutlich nach rechts. PMA löste bei reg1b und erg1 Δ 2-373 keine signifikante Verschiebung der Aktivierungskurven aus. Fehlerbalken entsprechen $K \pm S.E.M.$ und $PMA \pm S.E.M.$ Die Anzahl der Versuche ist in B angegeben.

Einfluss von PMA auf die Zeitabhängigkeit der Aktivierung

Es wurde untersucht, ob PMA bei der Zeitabhängigkeit der Aktivierung einen ähnlich verlangsamenden Einfluss auf die erg1-Kanäle ausübt wie TRH. Das Pulsprotokoll wurde bereits in Abschnitt 3.5.3 beschrieben, wobei hier auch über längere Zeitintervalle depolarisiert wurde.

Wie TRH war PMA in der Lage, die Zeitabhängigkeit der Aktivierung des in Iso-KCl-Lösung gemessenen endogenen *erg1*-Stroms der GH₃/B₆-Zellen zu verlangsamen. Die Zeit der halbmaximalen Aktivierung ($t_{0.5}$) der Kontrolle betrug durchschnittlich $0,16 \pm 0,03$ s, $t_{0.5}$ nach Zugabe von PMA $0,27 \pm 0,04$ s ($P = 0,01$; $n=6$, Abbildung 17 Aa). Noch deutlicher war die Verlangsamung der Aktivierung bei dem überexprimierten *erg1a*-Kanal, gemessen in 5 mM K⁺-Lösung. $t_{0.5}$ vergrößerte sich von $0,15 \pm 0,01$ s auf $0,4 \pm 0,05$ s ($P = 0,001$; $n=9$, Abbildung 17 Ab). Ebenfalls zu einer deutlichen, jedoch im Vergleich zum *erg1a* etwas geringeren Verlangsamung kam es bei den heteromeren *erg1a/b*-Strömen. Hier vergrößerte sich $t_{0.5}$ der Aktivierung von $0,13 \pm 0,01$ s auf $0,3 \pm 0,0$ s ($P = 0,001$; $n=8$, Abbildung 17 Ac). Zu keiner signifikanten Verlangsamung der Aktivierung kam es hingegen beim *erg1b* ($t_{0.5} = 0,15 \pm 0,02$ s vor und $t_{0.5} = 0,17 \pm 0,04$ s nach Applikation, $n=7$) und bei der Deletionsmutante HERG Δ 2-373 (Kontrolle $t_{0.5} = 0,21 \pm 0,04$ s und PMA $t_{0.5} = 0,09 \pm 0,02$ s, $n=5$, Abbildung 17 Ad und Ae). Abbildung 17 B zeigt vergleichend $t_{0.5}$ der verschiedenen *erg1*-Kanäle vor und nach PMA-Applikation.

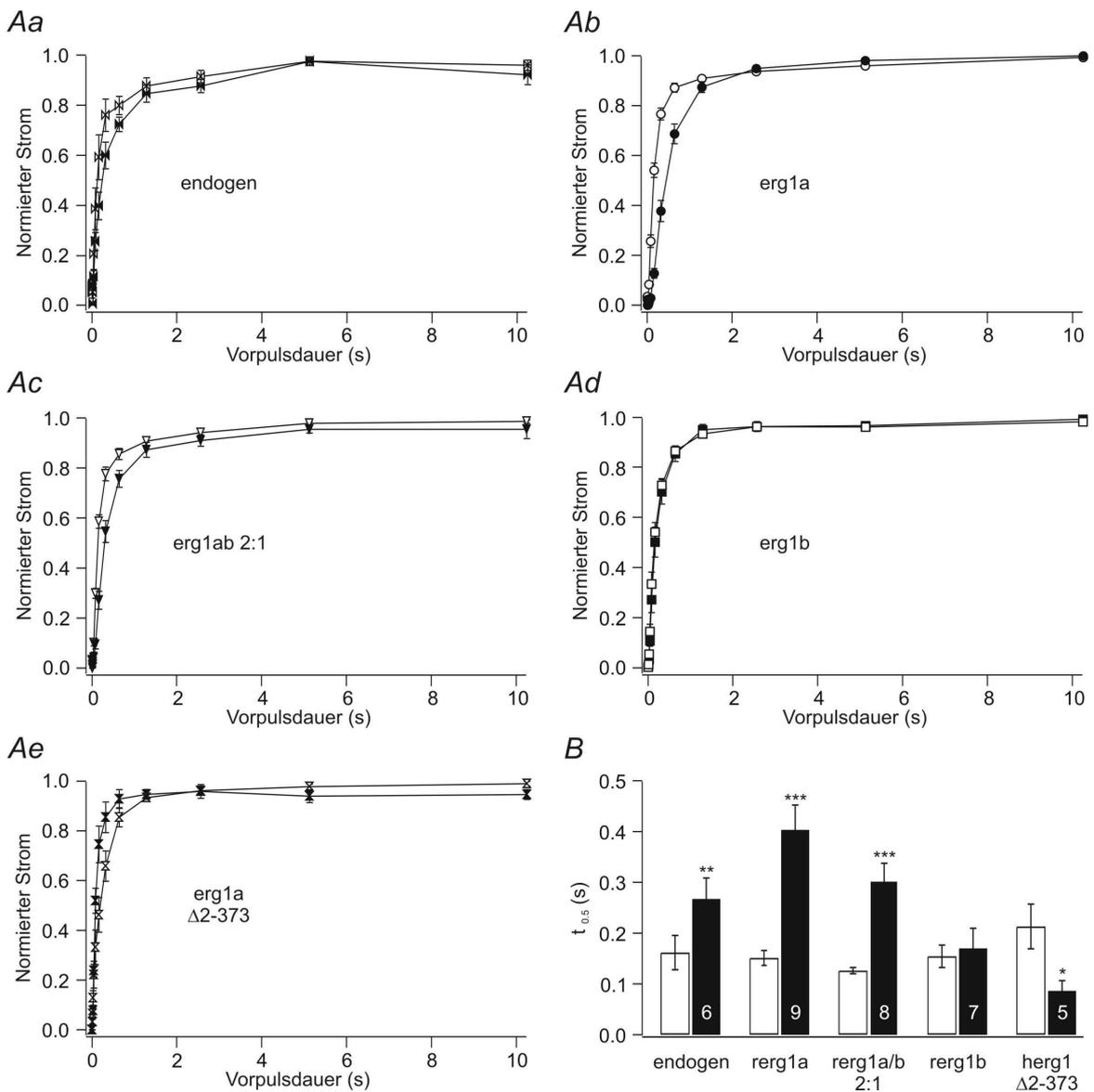


Abbildung 17: Wirkung von PMA auf den Zeitverlauf der Aktivierung verschiedener regg-Ströme in GH_3/B_6 -Zellen A, Verlauf der Aktivierung vor (offene Symbole) und nach (geschlossene Symbole) Applikation von PMA. Aa, Zeitverlauf der Aktivierung endogener erg-Ströme von GH_3/B_6 -Zellen gemessen in Iso-KCl-Lösung mit $t_{0.5}$ vor Applikation von $0,16 \pm 0,03$ s und $0,27 \pm 0,04$ s nach Applikation von $1 \mu\text{M}$ PMA ($P = 0,01$; $n=6$). Ab, Zeitverlauf heterolog exprimierter reg1a-Ströme gemessen in 5 mM K^+ -Lösung mit $t_{0.5}$ vor und nach Applikation von $0,15 \pm 0,01$ s bzw. $0,4 \pm 0,1$ s ($P = 0,001$; $n=9$). Ac, Zeitverlauf der Aktivierung der im Verhältnis 2:1 heterolog koexprimierten reg1a- und reg1b-Kanäle mit den $t_{0.5}$ $0,13 \pm 0,01$ s bzw. $0,3 \pm 0,0$ s vor und nach PMA-Applikation ($P = 0,001$; $n=8$). Ad und Ae, sowohl bei reg1b als auch bei HERG Δ 2-373 löste PMA keine signifikante Vergrößerung von $t_{0.5}$ aus. B, Vergleich der Verlangsamung des Zeitverlaufs der Aktivierung der unterschiedlichen reg1-Kanäle vor (weiße Balken) und nach (schwarze Balken) PMA-Applikation. Fehlerbalken entsprechen \pm S.E.M. ** und *** geben die Signifikanz des Unterschiedes vor und nach PMA - Applikation mit $P \leq 0,01$ beziehungsweise $P \leq 0,001$ an (einseitiger, gepaarter t-Test).

3.7.2 Einfluss von PMA auf erg-Kanäle in MMQ-Zellen

Einfluss von PMA auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

MMQ-Zellen verfügen wie GH₃/B₆-Zellen und anders als CHO-Zellen über endogene erg-Kanäle, nicht jedoch über TRH-Rezeptoren. Daher sollte untersucht werden, ob PMA, dessen Hauptwirkung im Gegensatz zu TRH nicht in der Bindung an einen Membranrezeptor mit gekoppelter Second-Messenger-Kaskade, sondern in der direkten Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) besteht, in der Lage ist, den erg-Strom in MMQ-Zellen zu modulieren. Die Messung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung fand wie im Abschnitt 3.1 beschrieben statt. Die halbmaximale Aktivierung des in Iso-KCl-Lösung gemessenen endogenen erg-Stroms der MMQ-Zellen lag vor PMA-Applikation bei $-37,9 \pm 2,8$ mV. Nach PMA-Zugabe kam es zu keiner signifikanten Veränderung des Wertes ($-35,6 \pm 2,5$ mV $n=4$). Jedoch nahm der verfügbare Strom nach Applikation zu (Abbildung 18 A).

Ebenfalls keine signifikante Veränderung von $V_{0,5}$ konnte durch PMA-Zugabe bei den in MMQ-Zellen heterolog überexprimierten erg1a - Strömen gemessen werden. Der $V_{0,5}$ betrug $-31,3 \pm 0,7$ mV vor bzw. $-31,5 \pm 1,4$ mV nach Applikation von PMA ($n=4$, Abbildung 18 B Mitte).

In einigen Experimenten wurde zusätzlich zum heterolog exprimierten erg1a-Kanal die cDNA für den TRH-Rezeptor in den MMQ-Zellen koinjiziert. Bei diesen Experimenten kam zu einer signifikanten Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung durch PMA. So veränderte sich $V_{0,5}$ von $-31,6 \pm 2,7$ mV vor auf $-18,7 \pm 1,7$ mV nach Applikation von PMA um durchschnittlich $12,3 \pm 2,8$ mV ($P = 0,01$; $n=6$, Abbildung 18 B rechts).

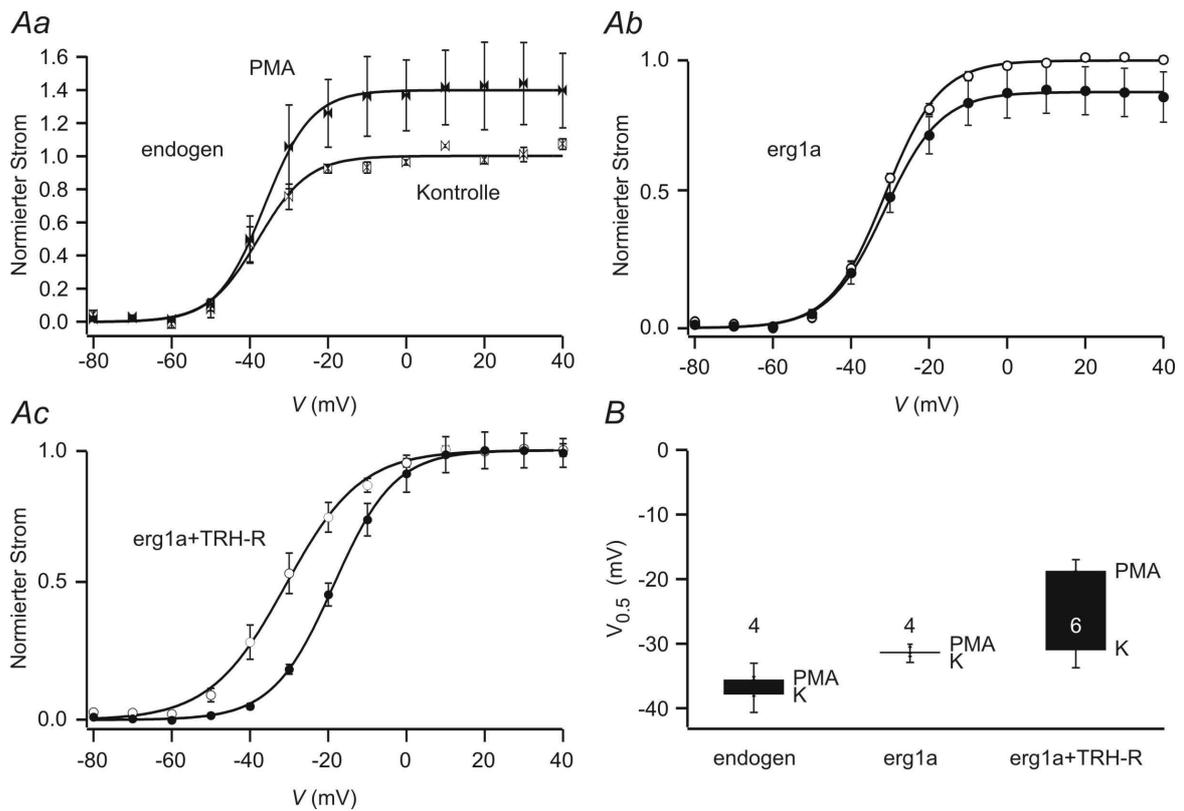


Abbildung 18: Einfluss von PMA auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung in MMQ-Zellen A, Aktivierungskurven verschiedener erg-Kanäle in MMQ-Zellen vor (offene Symbole) und nach (geschlossene Symbole) Applikation von PMA. Aa, Aktivierungskurven der endogenen erg-Ströme der MMQ-Zellen gemessen in Iso-KCl-Lösung. Ab, Aktivierungskurven heterolog exprimierter erg1a-Kanäle. Ac, Aktivierungskurven von heterolog exprimierten erg1a-Kanälen mit koexprimierten TRH-Rezeptoren. $V_{0.5}$ ist dem Text zu entnehmen. B, Vergleich der durch PMA induzierten Verschiebung von $V_{0.5}$ vor (K) und nach (PMA) PMA-Applikation. Bei den endogenen Strömen, sowie den Strömen der heterolog exprimierten erg1a-Kanäle kam es zu keiner signifikanten Verschiebung der Aktivierungskurven durch PMA. Nach Koexpression des erg1-Kanals mit dem TRH-Rezeptor kam es zu einer Verschiebung der Aktivierungskurven mit $\Delta V_{0.5} = 12,3 \pm 2,8$ mV nach rechts. Fehlerbalken entsprechen $K \pm S.E.M.$ und $PMA \pm S.E.M.$ Die Anzahl der Versuche ist in B angegeben.

Einfluss von PMA auf die Zeitabhängigkeit der Aktivierung

Abbildung 19 A zeigt den Zeitverlauf der Aktivierung von erg-Strömen in MMQ-Zellen. Das Pulsprotokoll wurde bereits in Abschnitt 3.5.3 beschrieben. PMA war nicht in der Lage, die Zeitabhängigkeit der Aktivierung des endogenen rerg-Stroms zu modulieren. Durch PMA-Applikation kam es bei diesem zu keiner signifikanten Verlangsamung der Aktivierung. Die Zeit der halbmaximalen Aktivierung ($t_{0,5}$) betrug $0,11 \pm 0,03$ s vor und $0,08 \pm 0,01$ s nach Applikation von PMA ($n=4$). Ebenfalls zu keiner Verlangsamung der Aktivierung kam es bei den heterolog exprimierten rerg1a-Kanälen. $t_{0,5}$ betrug vor Applikation $0,057 \pm 0,004$ s und nach Applikation $0,06 \pm 0,01$ s ($n=2$). Erst nach Koexpression des TRH-Rezeptors mit dem rerg1a-Kanal war eine leichte Verlangsamung der Aktivierung durch PMA messbar. So erfolgte die halbmaximale Aktivierung der Kontrolle nach $0,06 \pm 0,01$ s, und nach PMA-Applikation nach $0,08 \pm 0,01$ s ($P \leq 0,05$ $n=6$). In Abbildung 19 B wird $t_{0,5}$ der Aktivierung der verschiedenen rerg-Kanäle vor und nach PMA - Applikation verglichen.

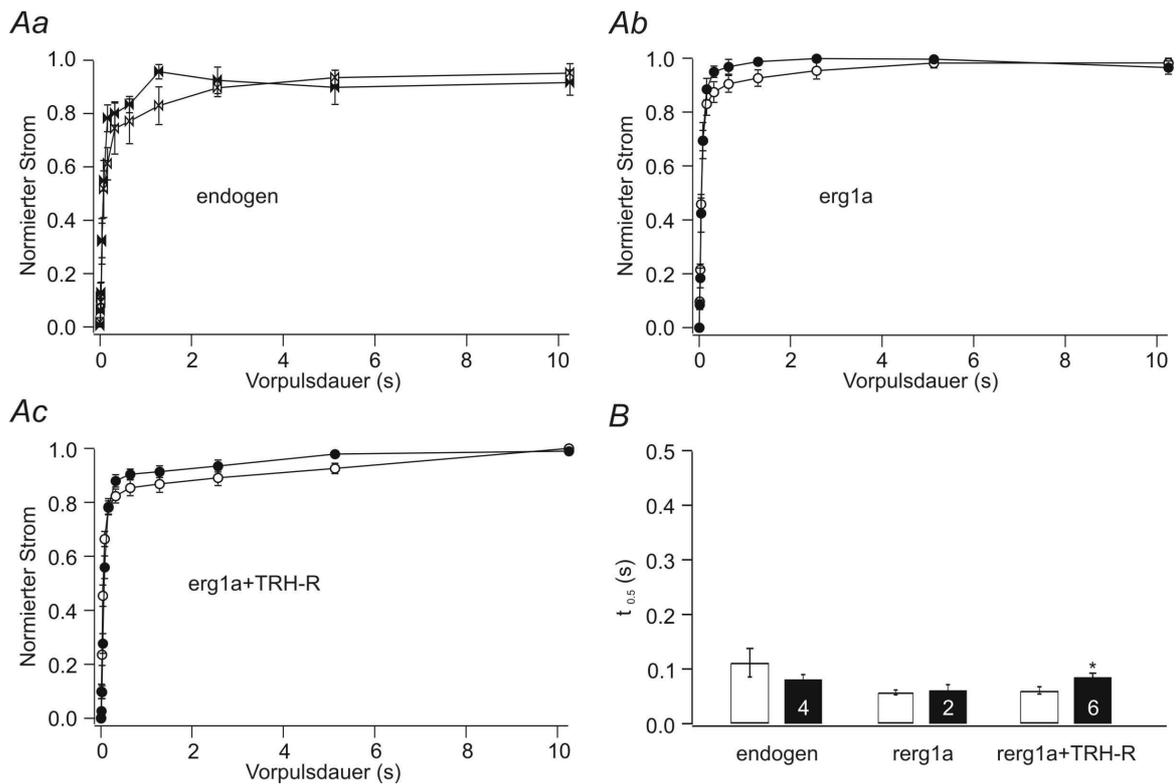


Abbildung 19: Wirkung von PMA auf den Zeitverlauf der Aktivierung verschiedener rerg-Kanäle in MMQ-Zellen A, Verlauf der Aktivierung vor (offene Symbole) und nach (geschlossene Symbole) Applikation von PMA. Aa, Zeitverlauf der Aktivierung der endogenen rerg-Ströme der MMQ-Zellen, gemessen in Iso-KCl-Lösung mit den $t_{0,5}$ von $0,11 \pm 0,03$ s vor bzw. $0,08 \pm 0,01$ s nach PMA-Applikation ($n=4$). Ab, Zeitverlauf der Aktivierung der heterolog exprimierten rerg1a-Kanäle. Die Zeiten für $t_{0,5}$ betragen $0,057 \pm 0,004$ s vor und $0,06 \pm 0,01$ s nach Applikation von PMA ($n=2$). Ac, heterolog exprimierte rerg1a-Kanäle mit koexprimierten TRH-Rezeptoren. $t_{0,5}$ der Kontrolle betrug $0,06 \pm 0,01$ s, es kam zu einer Zunahme von $t_{0,5}$ auf $0,08 \pm 0,01$ s nach PMA-Applikation ($P \leq 0,05$ $n=6$). B, Vergleich von $t_{0,5}$ der unterschiedlichen rerg1-Kanäle vor (weiße Balken) und nach (schwarze Balken) PMA-Applikation. Fehlerbalken entsprechen \pm S.E.M. * gibt die Signifikanz des Unterschiedes vor und nach PMA-Applikation mit $P \leq 0,05$ an (einseitiger, gepaarter t-Test).

3.7.3 Einfluss von TRH auf erg-Kanäle in MMQ-Zellen

Einfluss von TRH auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Wie bereits in der Einleitung zu diesem Teil erwähnt, besitzen MMQ-Zellen keinen funktionellen TRH-Rezeptor. Um zu testen, ob dennoch die Second-Messenger-Kaskade aktivierbar ist, die normalerweise durch TRH in laktotropen Zellen stimuliert wird, wurde der TRH-Rezeptor-Typ 1 durch cDNA-Injektion in MMQ-Zellen exprimiert.

Es wurde untersucht, ob TRH bei zusätzlich zum *reg1a*-Kanal exprimiertem TRH-Rezeptor die Aktivierungskurven des *erg*-Kanals in MMQ-Zellen so wie in GH₃/B₆-Zellen zu positiveren Potentialen verschieben kann.

Abbildung 20 A zeigt, dass TRH nicht in der Lage war, den heterolog exprimierten *reg1a*-Strom in MMQ-Zellen zu modulieren. $V_{0,5}$ veränderte sich durch TRH-Applikation nicht ($V_{0,5}$ Kontrolle: $-27,67 \pm 3,76$ mV, $V_{0,5}$ TRH: $-25,7 \pm 7,3$ mV, $n=4$). Erst nach Koexpression des TRH-Rezeptors mit *reg1a* konnte TRH die Aktivierungskurven des in den MMQ-Zellen heterolog exprimierten *reg1a*-Stroms zu positiveren Potentialen verschieben. Der $V_{0,5}$ -Wert der Kontrolle betrug $-26,4 \pm 2,8$ mV, nach TRH-Zugabe $-9,34 \pm 3,38$ mV ($P \leq 0,01$; $n=7$). Durchschnittlich wurde die Aktivierungskurve um $\Delta V_{0,5} = 17,06 \pm 2,07$ mV nach rechts verschoben. Ebenfalls kam es zu einer Reduktion des Stroms um ca. 25%. Auffallend war, dass es bei einigen Versuchen, bei denen der TRH-Rezeptor koexprimiert wurde, dennoch keine Verschiebung der Aktivierungskurve durch TRH gab ($n=5$). Die bei diesen Versuchen gemessenen Aktivierungskurven nach TRH-Applikation entsprechen denen der Kontrollen.

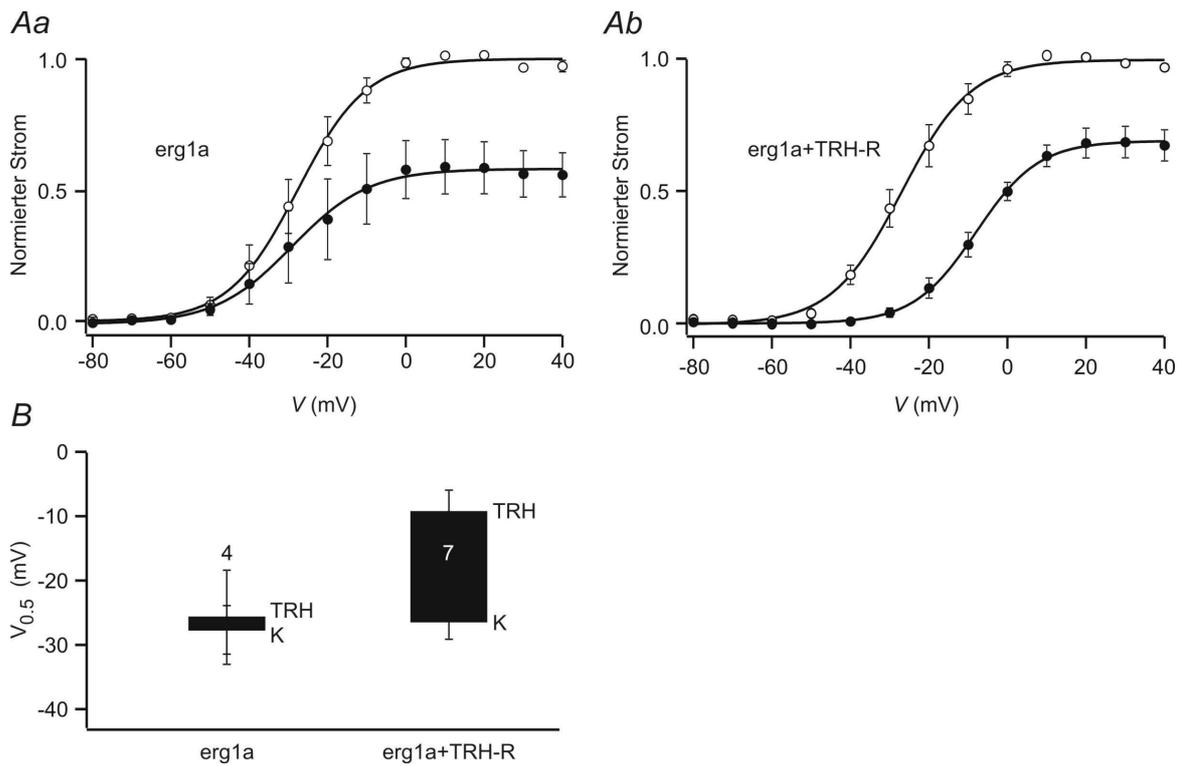


Abbildung 20: Einfluss von TRH auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von *erg1a* in MMQ-Zellen **A**, Aktivierungskurven heterolog exprimierter *erg1a*-Ströme in MMQ-Zellen gemessen in 5 mM-KCl-Lösung vor (offene Symbole) und nach TRH-Applikation (geschlossene Symbole). **B**, Vergleich der durch TRH verursachten Verschiebung von $V_{0.5}$ der heterolog exprimierten *erg1a*-Kanäle mit den $V_{0.5}$ der *erg1a*-Kanäle mit zusätzlich koexprimierten TRH-Rezeptoren vor (K) und nach (TRH) Applikation von TRH. TRH verschob $V_{0.5}$ um durchschnittlich $\Delta V_{0.5} = 17,06 \pm 2,07$ mV nach rechts von $-26,4 \pm 2,8$ mV vor auf $-9,34 \pm 3,38$ mV nach Applikation von TRH ($P = 0,01$; $n=7$). Fehlerbalken entsprechen $K \pm S.E.M.$ und $PMA \pm S.E.M.$ Die Anzahl der Versuche ist in **B** angegeben.

Einfluss von TRH auf die Zeitabhängigkeit der Aktivierung

Es wurde untersucht, ob bezüglich ihrer Aktivierungskinetik TRH in der Lage ist, in MMQ-Zellen heterolog exprimierte *reg1a*-Kanäle zu modulieren. Wurden *reg1a*-Kanäle ohne TRH-Rezeptor exprimiert, kam es durch TRH zu keiner Veränderung der Zeitabhängigkeit der Aktivierung ($t_{0,5}$ der Kontrolle betrug $0,09 \pm 0,02$ s, nach TRH-Zugabe $0,11 \pm 0,03$ s, $n=4$). Mit koexprimiertem TRH-Rezeptor verlangsamte sich die Aktivierung signifikant. Es kam zu einer Zunahme von $t_{0,5}$ der Kontrolle mit $0,09 \pm 0,01$ s auf $0,23 \pm 0,04$ s nach TRH Applikation ($P \leq 0,05$, $n = 7$).

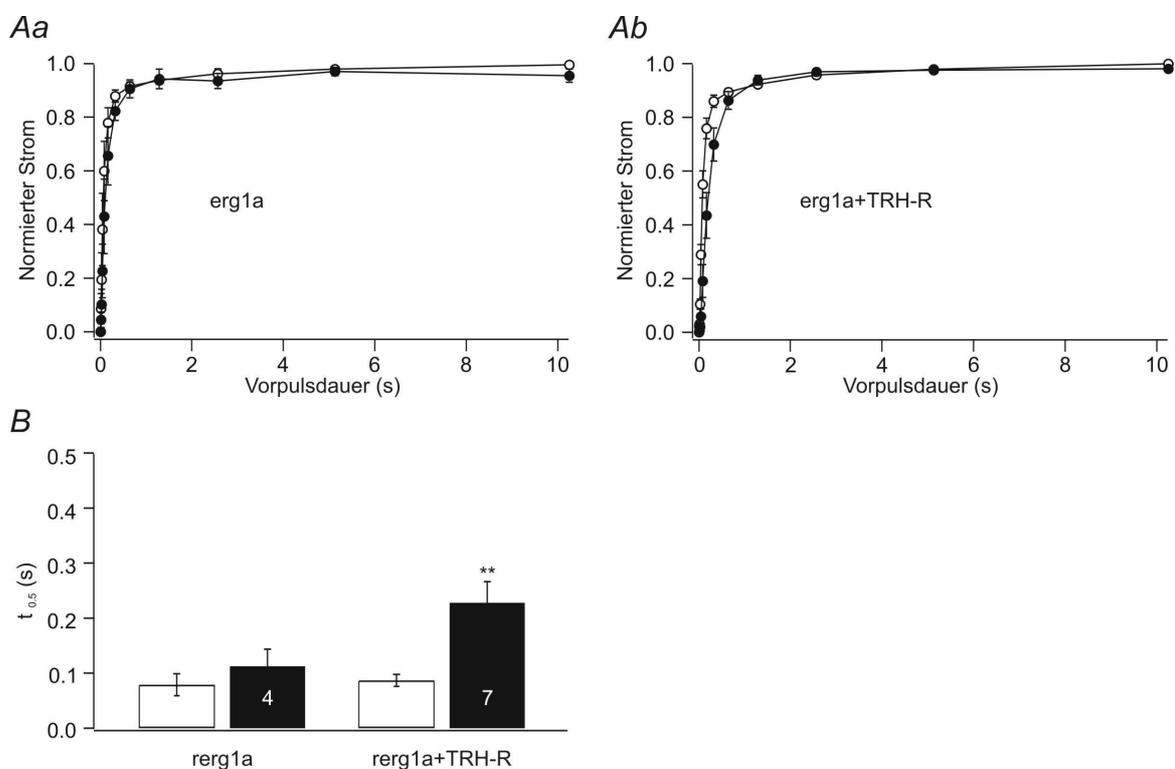


Abbildung 21: Verlangsamung des Zeitverlaufs der Aktivierung von *reg1a*-Kanälen in MMQ-Zellen durch TRH A, Verlauf der Aktivierung vor (offene Symbole) und nach (geschlossene Symbole) Applikation von TRH. Aa, Zeitverlauf der Aktivierung der heterolog in MMQ-Zellen exprimierten *reg1a*-Ströme mit $t_{0,5} = 0,09 \pm 0,02$ s vor und $t_{0,5} = 0,11 \pm 0,03$ s nach TRH-Applikation ($n=4$). Ab, heterolog exprimierte *reg1a*-Kanäle mit koexprimiertem TRH-Rezeptor. $t_{0,5}$ der Kontrolle betrug $0,09 \pm 0,02$ s, es kam zu einer Verlangsamung auf ein $t_{0,5}$ von $0,23 \pm 0,04$ s nach TRH-Applikation ($P \leq 0,05$; $n=7$). B, Vergleich von $t_{0,5}$ der *reg1a*-Kanäle vor (weiße Balken) und nach (schwarze Balken) TRH-Applikation. Fehlerbalken entsprechen \pm S.E.M. ** gibt die Signifikanz des Unterschiedes vor und nach TRH-Applikation an mit $P \leq 0,01$ (einseitiger, gepaarter t-Test).

3.7.4 Einfluss von TRH und PMA auf erg-Kanälen in CHO-Zellen

Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Da die Koexpression des TRH-Rezeptors dazu führte, dass sich der *reg1a*-Strom in MMQ-Zellen sowohl durch PMA als auch TRH modulieren ließ, obwohl beide Substanzen für sich nicht in der Lage waren, die endogenen bzw. die exprimierten *erg*-Kanäle zu beeinflussen, wurde untersucht, ob eine Modulation der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von *reg1a* durch TRH auch in CHO-Zellen möglich wird, wenn der TRH-Rezeptor koexprimiert wird. Als Kontrolle wurde PMA auf CHO-Zellen appliziert, die nur den *reg1a*-Kanal exprimierten. Für die Modulation durch TRH wurde zusätzlich zu dem *reg1a*-Kanal noch der TRH-Rezeptor koexprimiert. Abbildung 22 *Aa* zeigt die Aktivierungskurven von in CHO-Zellen heterolog exprimierten *reg1a*-Strömen. Nach Applikation von PMA kommt es bei diesen zu keiner Veränderung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung ($V_{0,5}$ Kontrolle: $-33,6 \pm 3,8$ mV, nach Applikation $30,7 \pm 2,8$ mV; $n=6$). Auch wenn zusätzlich zu dem *reg1a*-Kanal noch TRH-Rezeptoren exprimiert wurden, kam es zu keiner Verschiebung der Aktivierungskurven durch TRH ($V_{0,5}$ Kontrolle: $-31,5 \pm 3,5$ mV, $V_{0,5}$ nach TRH-Applikation: $32,46 \pm 3,31$ mV, $n=5$, Abbildung 22 *Ab*). Weil TRH auch unter diesen Bedingungen den *erg*-Strom nicht modulierte, wurde auf einen entsprechenden Versuch mit PMA verzichtet.

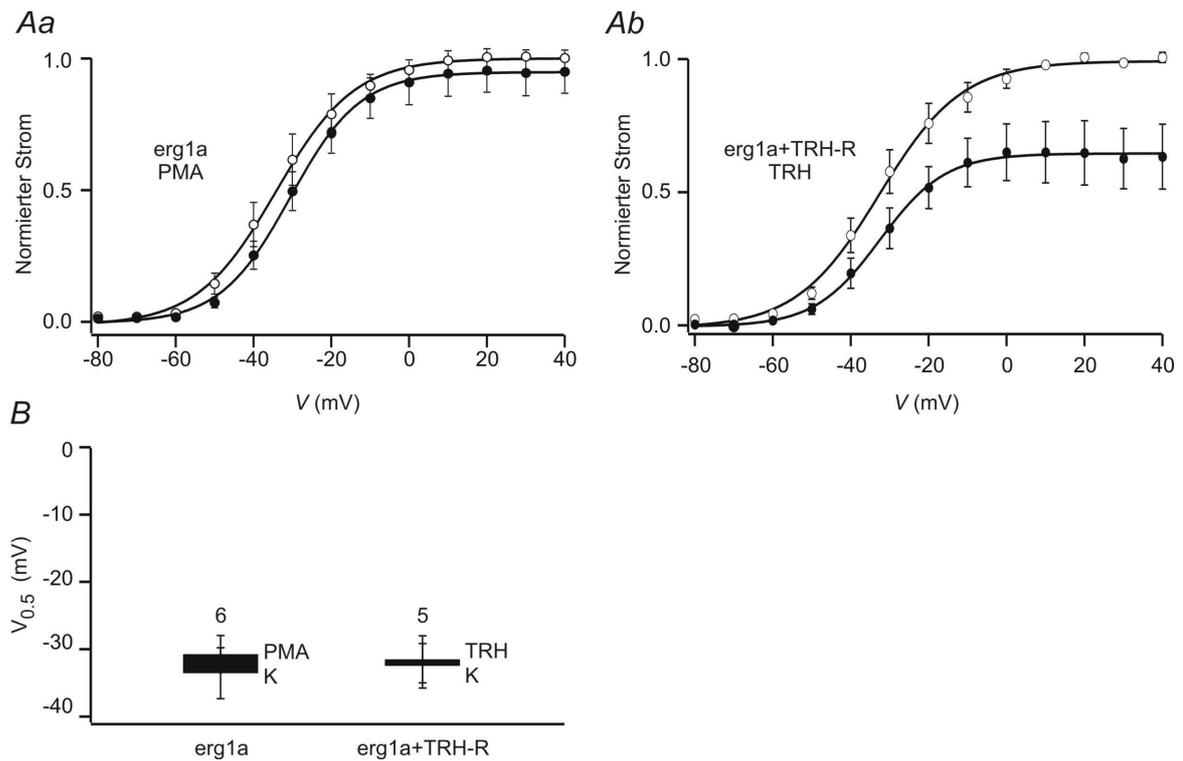


Abbildung 22: Einfluss von PMA und TRH auf *erg1a*-Kanäle in CHO-Zellen *Aa*, Aktivierungskurven von *erg1a*-Strömen exprimiert in CHO-Zellen vor (offene Symbole) und nach (geschlossene Symbole) Applikation von PMA. Es kam zu keiner signifikanten Veränderung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung. *Ab*, Aktivierungskurven von *erg1a*-Strömen mit koexprimierten TRH-Rezeptoren vor (offene Symbole) und nach (geschlossene Symbole) Applikation von TRH. Auch mit koexprimiertem TRH-Rezeptor bewirkte TRH keine Veränderung in der Spannungsabhängigkeit. *B*, Vergleich von $V_{0.5}$ der heterolog exprimierten *erg1a*-Ströme und von *erg1a*-Strömen mit koexprimierten TRH-Rezeptoren vor (K) und nach PMA - Applikation (PMA) bzw. vor (K) und nach TRH-Applikation (TRH). Fehlerbalken entsprechen $K \pm S.E.M.$ und $PMA \pm S.E.M.$ Die Anzahl der Versuche ist in *B* angegeben.

Einfluss von PMA und TRH auf die Zeitabhängigkeit der Aktivierung

Wie bereits bei der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, wurde unter den gleichen Bedingungen untersucht, ob PMA oder TRH eine Verlangsamung der Aktivierung herbeiführen können. Wie bei der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, wurde die Aktivierungsgeschwindigkeit der *reg1a*-Ströme weder durch PMA noch durch TRH beeinflusst, trotz des koexprimierten TRH-Rezeptors. So betrug $t_{0,5}$ der Kontrolle $0,096 \pm 0,017$ s bzw. $0,10 \pm 0,04$ s nach PMA-Zugabe (Abbildung 23 Aa, $n=4$). Bei den Versuchen mit TRH wurden folgende Werte gemessen: $t_{0,5}$: Kontrolle: $0,095 \pm 0,008$ s; $t_{0,5}$: TRH $0,093 \pm 0,008$ s (Abbildung 23Ab, $n=9$).

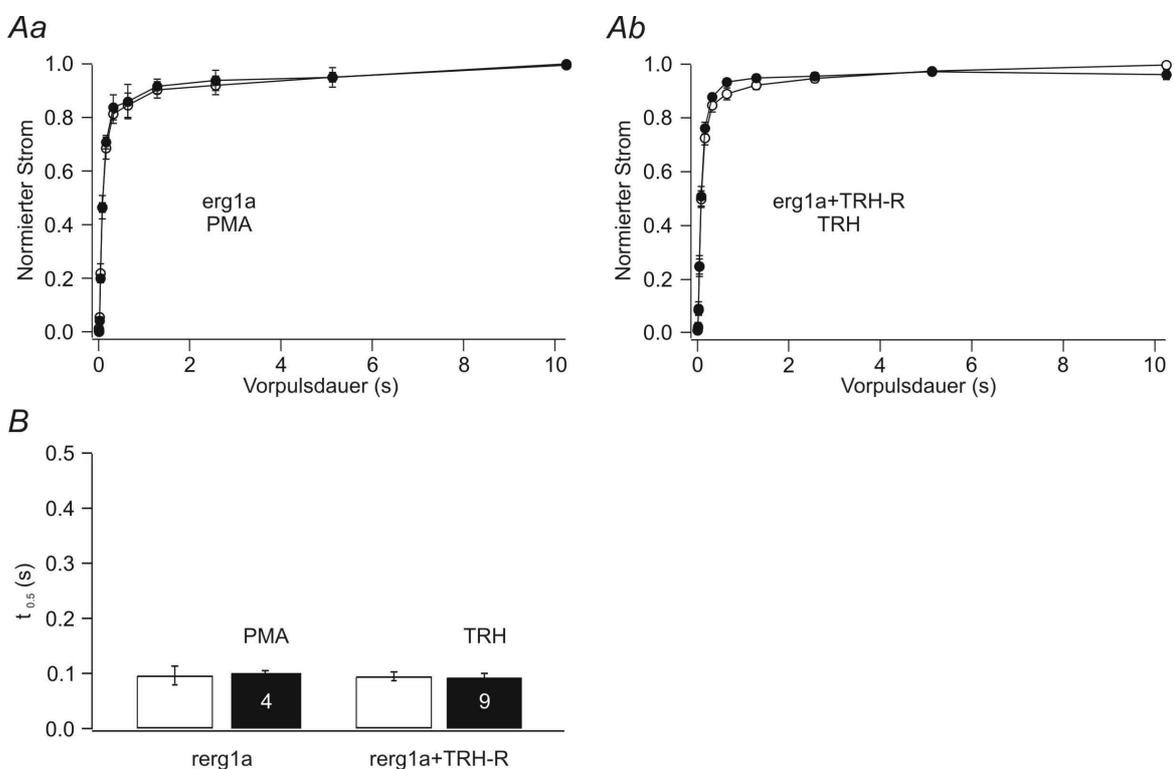


Abbildung 23: Einfluss von PMA und TRH auf die Zeitabhängigkeit der Aktivierung von *reg1a* in CHO-Zellen A, Verlauf der Aktivierung vor (offene Symbole) und nach (geschlossene Symbole) Applikation von PMA bzw. TRH. Aa, Einfluss von PMA auf heterolog in CHO-Zellen exprimierte *reg1a*-Kanäle. Die Zeit der halbmaximalen Aktivierung veränderte sich nicht signifikant von $t_{0,5}$: $0,096 \pm 0,017$ s bei der Kontrolle auf $t_{0,5}$: $0,10 \pm 0,04$ s nach Applikation von PMA ($n=4$). Ab, Einfluss von TRH auf heterolog exprimierte *reg1a*-Kanäle in CHO-Zellen mit koexprimiertem TRH-Rezeptor. $t_{0,5}$ betrug $0,095 \pm 0,008$ s (Kontrolle) bzw. $0,093 \pm 0,008$ s (nach TRH-Applikation, $n=9$). B, Vergleich von $t_{0,5}$ vor (offene Balken) und nach (gefüllte Balken) PMA- (links) und TRH- (rechts) Applikation. Fehlerbalken entsprechen \pm S.E.M.

4 Diskussion

Im Zentrum dieser Arbeit stand die Untersuchung der TRH-Modulation von erg-Strömen in laktotropen Zellen. Dies ist die erste Beschreibung der TRH-Modulation von der Spleißvariante *reg1b*, die auch in laktotropen Zellen der Ratte vorhanden ist. In dieser Arbeit wurden zunächst die durch TRH verursachten Veränderungen der biophysikalischen Eigenschaften von *reg1a*-, *reg1b*- und *reg1a/b*-Kanäle, die nach Koexpression von *reg1a*- und *reg1b*-Untereinheiten gebildet wurden, untersucht. Als Expressionssystem wurden GH_3/B_6 -Zellen, eine aus einem Ratten-Hypophysentumor gewonnene Zelllinie, verwendet, weil diese über eine funktionierende endogene Signalkaskade vom TRH-Rezeptor bis zum erg-Kanal verfügen, was ein großer Vorteil ist. Außerdem konnte in laktotropen MMQ-Zellen, die nativ keine TRH-Rezeptoren besitzen, die TRH-Modulation der erg-Ströme durch Expression des TRH-Rezeptors rekonstituiert werden, nicht jedoch in CHO-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die elektrophysiologischen Eigenschaften der erg-Kanäle durch TRH unterschiedlich moduliert werden.

4.1 Biophysikalische Eigenschaften von erg-Strömen in GH_3/B_6 -Zellen und Modulation durch TRH

Es konnte mittels PCR bereits gezeigt werden, dass GH_3/B_6 -Zellen über Transkripte für *reg1*-Kanäle verfügen (diese Arbeit, Bauer et al., 1998). In einer anderen Arbeit konnten auch Transkripte für *reg2* - Kanäle nachgewiesen werden (Wulfsen et al., 2000). Die aktuellen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass GH_3/B_6 -Zellen über die Spleißvariante *reg1a*, nicht jedoch über *reg1b* verfügen.

Die Modulation der endogenen Ströme (Bauer et al., 1990) konnte hier bestätigt werden. Den Messungen kam eine besondere Eigenschaft der erg-Kanäle zugute, nämlich der ungewöhnlich große Anstieg der Leitfähigkeit bei Zunahme der extrazellulären K^+ -Konzentration, der bei allen drei Mitgliedern der erg-Familie auftritt (Shibasaki 1987, Sturm et al., 2005). Diese Eigenschaft der erg-Kanäle hat es ermöglicht, den endogenen erg-Strom der GH_3/B_6 -Zellen zu untersuchen, da dieser durch Messung in Iso-KCl-Lösung stark vergrößert wurde. Dazu kommt noch die Vergrößerung der Einwärtsstromamplituden durch die Verschiebung des Umkehrpotentials für K^+ zu positiverem Potential. Außerdem konnten die GH_3/B_6 -Zellen als Expressionssystem für andere erg-Kanäle verwendet werden. Diese Kanäle ließen sich aufgrund ihrer starken

Expression auch in extrazellulärer 5 mM K⁺-Lösung messen, also unter eher physiologischen Bedingungen. In dieser niedrigen K⁺-Konzentration war der endogene erg-Strom der GH₃/B₆-Zellen im Vergleich zu den Strömen der überexprimierten *reg1a*- und *reg1b*-Kanäle vernachlässigbar klein und beeinflusste diese daher vermutlich nicht. Somit konnte angenommen werden, dass der gesamte gemessene Strom in seinen Eigenschaften den heterolog exprimierten erg-Kanälen entsprach.

4.1.1 GH₃/B₆-Zellen als Expressionssystem für die Analyse der durch TRH ausgelösten erg-Strom-Modulation

Die Abhängigkeit der beobachteten Effekte von der TRH-Konzentration wurde an nativen erg-Strömen untersucht. Dazu wurde die durch TRH verursachte Verschiebung der Aktivierungskurve als ein Parameter für die Wirksamkeit der verwendeten TRH-Konzentration verwendet. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRH bereits in einer Konzentration von 10 nM den erg-Strom beeinflusste. Dieser Wert stimmt gut mit dem EC₅₀-Wert von 8 nM für Phosphoinositidhydrolyse durch TRH in GH₃-Zellen überein (McDermott et al., 1990). Obwohl eine TRH-Konzentration von 100 nM einen vollständigen Effekt auf die erg-Kanäle ausübte, wurde dennoch bei den mit überexprimierten erg-Kanälen durchgeführten Experimenten mit einer Konzentration von 1 μM gearbeitet, um eine möglichst schnelle und vollständige Aktivierung der modulierenden Signalkaskade zu erreichen.

Die Komponenten der Signalkaskade wurden bisher nicht vollständig identifiziert (Corrette et al., 1995). Der TRH-Rezeptor hat die Besonderheit, sehr viele verschiedene G-Proteingekoppelte Signalwege aktivieren zu können. Es wurde berichtet, dass verschiedene G-Proteine, wie z.B. G_s oder G₁₃ und nicht nur das bereits vermutete G_{q11} an der TRH-induzierten Modulation der erg-Kanäle beteiligt sind (Bauer et al., 1994, Storey et al., 2002; Miranda et al., 2005). Dabei treten mitunter widersprüchliche Ergebnisse auf, die sich wahrscheinlich aus der Verwendung unterschiedlicher Zellsysteme ergeben. Um so wichtiger ist es, ein Zellsystem wie GH₃/B₆-Zelllinie zu verwenden, bei der unter der Vielzahl an möglichen Signalwegen derjenige angesprochen wird, der in laktotropen Zellen für die erg-Modulation verantwortlich ist.

4.1.2 Unterschiede zwischen den biophysikalischen Eigenschaften von *erg1a* und *erg1b*

Anstelle der N-terminalen Aminosäuren 1-376 des *erg1a*, besitzt der *erg1b* eine eigene abweichende N-terminale Aminosäuresequenz von 36 Aminosäuren. Daher fehlt dem *erg1b* neben einer großen Anzahl potentieller Phosphorylierungsstellen und weiterer möglichen Konsensussequenzen, die der *erg1a* besitzt, auch die für die EAG-Kanäle typische EAG- oder PAS-Domäne. Dieser wird eine wichtige Rolle bei der Deaktivierungsverlangsamung zugesprochen (Chen et al., 1999). Der offensichtlichste und am besten beschriebene Unterschied zwischen den beiden Spleißvarianten *erg1a* und *erg1b* besteht daher in der Deaktivierungskinetik (London et al., 1997; Lees-Miller et al., 1997). Diese Untersuchungen wurden an humanen und murinen *erg*-Kanälen durchgeführt. In dieser Arbeit wurden nun vergleichbare Ergebnisse mit den homologen Ratten-*erg*-Kanälen erzielt. Da die N-Termini des Maus- und des Ratten-*erg*-Kanals vollständig identisch sind, waren diese Ergebnisse zu erwarten. Die wesentlich schnellere Deaktivierung des *erg1b* im Vergleich zum *erg1a* ist auf den kurzen N-Terminus des *erg1b* zurückzuführen. Die Spleißvariante *merg1a'*, der nur ein kurzes Stück von 57 Aminosäuren des *merg1a* fehlt, weist ebenfalls eine schnelle Deaktivierung auf (London et al., 1997). Für die Verlangsamung der Deaktivierung sind die Aminosäuren 2-16 hauptverantwortlich, wie durch HERG Deletionsmutanten (Wang et al., 1998) und Koexpression dieses kurzen Stückes des N-Terminus gezeigt werden konnte (Wang et al., 2000).

Die in der vorliegenden Arbeit parallel und unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführten Experimente zeigen, dass *erg1a* um ca. 10 mV negativer aktiviert als *erg1b*. Dieser Unterschied zwischen den beiden Spleißvarianten wurde in bisherigen Untersuchungen, die in CHO-Zellen mit erhöhtem extrazellulären Kalium (40 mM K⁺) durchgeführt wurden, nicht entdeckt (Hirdes et al., 2005). Die unterschiedlichen Expressionssysteme waren mit großer Wahrscheinlichkeit nicht die Ursache für diese Differenz, da sie in GH₃/B₆- und in CHO-Zellen gemessen werden konnte. Es kann allerdings auch zu Unterschieden in der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zwischen Sätzen von Experimenten mit größerem zeitlichen Abstand kommen. Obwohl diese in verschiedenen Datensätzen auftretenden Differenzen in GH₃/B₆-Zellen nicht so groß ausfielen wie in CHO-Zellen, wurde bei den Versuchen in dieser Arbeit Wert darauf gelegt, die Vergleichsmessungen zwischen *erg1a*, *erg1b* und *erg1a/erg1b* immer parallel durchzuführen.

Es wurden Unterschiede im Zeitverlauf der Aktivierung zwischen *erg1a*- und *erg1b*-

Kanälen beschrieben (Lees-Miller et al., 1997; Hirdes et al., 2005), wonach *reg1b* eine im Vergleich zum *reg1a* wesentlich schnellere Aktivierung aufweist. Dieses konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Eine schnellere Aktivierung wurde ebenfalls für *HERG Δ 2-370*-Ströme beschrieben (Viloria et al., 2000). Im Gegensatz dazu weisen *HERG Δ 2-354*-Kanäle keine im Vergleich zum WT-*HERG* beschleunigte Aktivierung auf. Diese Mutante neigte sogar eher zu einer langsameren Zeitkonstante der Aktivierung (Wang et al., 1998). Das Entfernen des proximalen N-Terminus kleiner als bis zur Aminosäure 355 verlangsamt also die Aktivierung, während darüber hinausgehende Deletionen sie beschleunigt. Die Sequenz Δ 355-373 scheint also der Scheidepunkt zwischen einer distalen (EAG-Domäne) und einer proximalen Funktionseinheit (ERG-spezifische Domäne) des N-Terminus zu sein. Beide scheinen gegensätzlichen Einfluss auf die *HERG* Aktivierung zu haben (Viloria et al., 2000). Stark vereinfacht könnte man sagen, dass die EAG-Domäne die Deaktivierung verlangsamt, während die ERG-spezifische Domäne die Aktivierung verlangsamt, jedoch ist die genaue Funktion und das Zusammenspiel der einzelnen Domänen bisher ungeklärt. Die in dieser Arbeit verwendete Deletionsmutante *HERG Δ 2-373* simuliert die Aktivierungs- und Deaktivierungsbeschleunigung von *reg1b*, dem die Aminosäuren 1-376 fehlen.

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Untersuchung weisen einen deutlichen Unterschied in der stationären Inaktivierung zwischen *reg1a*- und *reg1b*-Kanälen auf. Im Vergleich zu *reg1a*-Kanälen sind die Inaktivierungskurven der *reg1b*-Kanäle um mehr als 50 mV zu positiveren Potentialen hin verschoben, wodurch es zu einer deutlich kleineren Einwärtsrektifizierung und zu deutlich größeren Auswärtsströmen bei ihnen kommt. Auch hier gibt es Parallelen zwischen *reg1b*-Kanälen und den Deletionsmutanten. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Anwesenheit des N-Terminus den Inaktivierungszustand unterstützt und stabilisiert, wodurch es zu einer stärkeren Einwärtsrektifizierung kommt (Wang et al., 1998).

4.1.3 Eigenschaften der *erg*-Ströme aus koexprimierten *reg1a*- und *reg1b*-Untereinheiten

Die hier gezeigten Charakteristiken der *reg1a/1b*- Ströme in GH_3/B_6 -Zellen vergrößern das Wissen über die heteromeren *erg1*-Stromeigenschaften. Diese Arbeit kann zeigen, dass nicht nur unterschiedliche Mitglieder der *erg* Familie heteromere *erg*-Kanäle bilden (Wimmers et al., 2001), sondern auch Spleißvarianten des *erg1*. *Erg*-Ströme aus *reg1a*- und *reg1b*-Untereinheiten wiesen ebenso sowohl intermediäre Eigenschaften als auch von einer Untereinheit dominierte Eigenschaften auf, wie schon in ähnlicher Weise für

Maus-*erg1a* und *-erg1b* beschrieben wurde (London et al., 1997).

Die Ergebnisse zeigen, dass die *reg1a*-Untereinheiten die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung in heteromeren *reg1a/1b*-Kanälen dominieren. Hingegen liegt die Spannungsabhängigkeit der stationären Inaktivierung der *reg1a/1b*-Ströme (1:3) zwar zwischen der der beiden homomeren Ströme, aber mit einer Tendenz in Richtung von *reg1b*-Strömen. Dadurch, dass also beim heteromeren Strom die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung bei relativ negativen und die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung bei relativ positiven Potentialen liegt, ergibt sich, dass die Amplitude des heteromeren *reg1a/1b* Fensterstroms wesentlich größer ist als die des *reg1a*, obwohl die Maxima bei den selben Spannungen lagen. Kanäle aus *reg1b*- und *reg1a*-Untereinheiten haben also im Vergleich zu homomeren *reg1a*-Kanälen deutlich vergrößerte stationäre Ströme in einem Spannungsbereich, der nahe dem Schwellenwertpotential für Aktionspotentiale und dem Ruhepotential in zahlreichen Zelltypen ist.

Der Zeitverlauf der Aktivierung der heteromeren *erg1*-Ströme ähnelt bei Überwiegen der *reg1a*-Untereinheit eher dem des *reg1a*-Stroms und bei Überwiegen der *reg1b*-Untereinheit eher dem des *reg1b*-Stroms. Ein weiteres Indiz dafür, dass die koexprimierten Untereinheiten tatsächlich Heteromere gebildet haben, ist, dass die Rektifizierung, also das Verhältnis von Auswärts- zu Einwärtsstrom, des Stroms bei Koexpression beider Untereinheiten dem *reg1b* gleicht, während *reg1a*-Stöme eine wesentlich stärkere Einwärtsrektifizierung aufweisen.

Als klare Bestätigung für die Bildung heteromerer *reg1a/1b*-Kanäle dienten Koexpressionsversuche mit *reg1b* und der dominant-negativen *reg1a*-Mutante *reg1G630S* (Wimmers et al., 2001). Die Koexpression von *reg1aG630S*- und *reg1b*-Untereinheiten in dem Verhältnis 1:3 führte zu einer sehr starken und im Verhältnis 2:1 zu einer nahezu kompletten Reduktion des *erg*-Stroms. Als weiterer Hinweis auf die Bildung von Heteromultimeren dienten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der koexprimierten EGFP- und DS-Red-markierten *reg1a*- und *reg1b*- Untereinheiten, die eine augenscheinlich perfekte Überlagerung in ihrer subzellulären Anordnung zeigten. Hinweise darauf, dass sich auch in nativen Geweben heteromere *reg1a/1b*-Kanäle bilden, wurden durch Koimmunopräzipitation im Herzgewebe des Menschen und des Kaninchens erhalten (Jones et al., 2004), ebenso wie in Tumorzellen (Crociani et al., 2003) und dem Mäusegehirn (Guasti et al., 2005).

Bei Expression der *reg1a*- oder *reg1b*-Kanäle in GH_3/B_6 -Zellen zeigten die *reg1a*-Kanäle eine deutlich diffusere Verteilung in der Zelle als die *reg1b*-Kanäle, die häufig deutlich erkennbare „Verklumpungen“ in der Zelle bildeten. Diese Beobachtung könnte bedeuten, dass die niedrigere *reg1b*-Stromdichte nicht auf eine geringere Expression des

Kanals, sondern auf eine geringere Anzahl von funktionellen Kanälen in der Plasmamembran zurückzuführen war. Eine deutlich geringere funktionelle Expression des *erg1b*-Kanals der Maus (*merg1b*) im Vergleich zum *erg1a*-Kanal (*merg1a*) wurde schon für *Xenopus* Oocyten als Expressionssystem beschrieben (London et al., 1997). Diese Unterschiede in der Stromdichte wurden genutzt, um zu zeigen, dass bei Koexpression die *merg1a*- Untereinheiten mit den *merg1b*- Untereinheiten interagieren, wodurch mehr funktionelle *erg*-Kanäle mit deutlich erhöhter Stromdichte und intermediären Deaktivierungseigenschaften in der Plasmamembran auftraten (London et al., 1997). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse über die schrittweise Veränderung der Deaktivierungskinetik bei zwei verschiedenen Verhältnissen der injizierten *reg1a*- und *reg1b*-cDNA bestätigten die bisherigen Beobachtungen. Die Verlangsamung der Deaktivierung von *erg*-Strömen wird dabei vermutlich durch die N-terminale EAG-Domäne verursacht, die nur beim *erg1a* vorhanden ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine kleine wasserlösliche N-terminale Domäne, die separat exprimiert wurde, dosisabhängig die Deaktivierung eines HERG-Kanals verlangsamt, wenn diesem der N-Terminus fehlt (Wang et al., 2000). Es wird auch vermutet, dass die Beteiligung von *erg1b*-Untereinheiten für die relativ schnelle Deaktivierung des I_{Kr} im Herzen verantwortlich ist (London et al., 1997).

4.1.4 Unterschiede in der TRH-induzierten Modulation von *reg1a*- und *reg1b*-Kanälen

In dieser Arbeit wurden *erg1*-Kanäle der Ratte in der klonalen somatomammotropen GH₃/B₆-Zelllinie überexprimiert, um ihre Modulation durch TRH zu untersuchen. Die Experimente zeigten, dass sowohl der *reg1a*- als auch der *reg1b*-Strom deutlich durch TRH reduziert wurden, allerdings traten auch deutliche Unterschiede in Bezug auf den Wirkmechanismus von TRH auf. Wie schon durch andere Arbeiten gezeigt (Bauer et al., 1990; Barros et al., 1998; Schledermann et al., 2001), verursachte TRH bei *reg1a* eine deutliche Reduktion des maximal verfügbaren Stroms, eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu positiveren Potentialen, eine Beschleunigung der Deaktivierung sowie eine Verlangsamung der Aktivierungskinetik. Die durch TRH bei *reg1b* verursachten Effekte unterscheiden sich klar von denen, die TRH bei *reg1a* auslöst. So war die Reduktion des maximal verfügbaren Stroms größer als bei *reg1a*, es kam jedoch zu keiner Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, ebenso kam es zu keiner beschleunigten Deaktivierung und die Aktivierung wurde nur schwach verlangsamt.

Wie bei dem *reg1b*-Kanal konnte hier auch bei der HERG-Mutante *HERG Δ 2-373* eine verminderte TRH-Empfindlichkeit nachgewiesen werden. Sie wies eine Deletion des N-Terminus auf einer Region, die dem menschlichen oder dem *reg1b*-Kanal der Ratte ebenfalls fehlt und die PAS- und die ERG-spezifische Domäne enthält. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen (Gómez-Varela et al., 2003a) auch, wenn ein kurzes Stück am proximalen N-Terminus deletiert wurde (*HERG Δ 326-373*), das die ERG-spezifische Domäne enthält.

Ebenfalls wurde eine ähnliche Modulation durch TRH für *reg3*-Kanäle beschrieben. Im Vergleich zu *reg1a* äußern sich die Effekte von TRH auf die *reg3*-Kanäle in einer deutlich stärkeren Reduktion des Stroms, einer verringerten Verschiebung der Aktivierungskurve und keiner Beschleunigung der Deaktivierung (Schledermann et al., 2001). Entsprechend den *reg1b*-Kanälen weisen die *reg3*-Kanäle eine schnellere Deaktivierung und eine verringerte stationäre Inaktivierung auf (Shi et al., 1997).

4.1.5 TRH verursachte Modulation von heteromeren *reg1a/1b*-Kanälen

Obwohl bei den Kontrollmessungen der heteromeren *reg1a/1b*-Ströme keine deutliche Dominanz von *reg1b*-Untereinheiten erkennbar war, wies *reg1b* einen „dominant-negativen“ Effekt in Bezug auf die Modulation der Aktivierung durch TRH auf. Am meisten überraschte es, dass die *reg1b*-Untereinheiten die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung der heteromeren *reg1a/1b*-Kanäle durch TRH verhinderten. Ebenfalls wurden die Aktivierung der heteromeren *reg1a/1b* Kanäle durch TRH wesentlich geringer verlangsamt als die der *reg1a*-Kanäle oder auch gar nicht verlangsamt, wenn der Anteil an *reg1b*-Untereinheiten groß war. Als Konsequenz ergibt sich daraus, dass die Reduktion des *reg1*-Auswärtsstromes durch TRH bei Koexpression von *reg1a*- mit *reg1b*-Untereinheiten weniger stark ausfällt. Da der Auswärtsstrom aber physiologisch entscheidend für die Einstellung des Ruhemembranpotentials ist, würde dies bedeuten, dass TRH das Membranpotential weniger depolarisieren würde.

Je höher der Anteil an *reg1b*, desto schneller deaktivierten die heteromeren *reg1a/1b*-Ströme und um so weniger konnte TRH eine Beschleunigung der Deaktivierung herbeiführen. Die Deaktivierungsgeschwindigkeit von homomeren *reg1b*-Strömen veränderte sich gar nicht mehr. Vermutlich wird die Fähigkeit des *reg1a*-N-Terminus zur Verlangsamung der Deaktivierung (Wang et al., 2000) durch TRH behindert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die variable TRH-Empfindlichkeit der heteromeren *reg1a/1b*- Kanäle abhängig ist vom Verhältnis von *reg1a*- und *reg1b*-Untereinheiten, und dass dafür die unterschiedlichen N-Termini von *reg1a* und *reg1b*

verantwortlich sind.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Besonderheiten der biophysikalischen Eigenschaften von *erg1b*- und heteromeren *erg1a/1b* Kanälen und ihre Modulation durch TRH bei der Untersuchung von *erg*-Strömen in allen *erg1b* koexprimierenden Geweben in Betracht gezogen werden sollte. Neben dem Herzen wurden *erg1b*-Transkripte ebenfalls im Gehirn, der Lunge und der Muskulatur (Lees-Miller et al., 1997, London et al., 1997) nachgewiesen. Des Weiteren konnte eine Koexpression von *erg1a* und *erg1b* sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene im Mäusegehirn nachgewiesen werden (Guasti et al., 2005). Koexpression von *erg1b* mit anderen *erg*-Transkripten wurde auf Einzelzellebene in Neuronen der Rapheregion in Ratten gezeigt, in denen die endogenen *erg*-Ströme eine relativ schnelle Aktivierung und Deaktivierung aufwiesen (Hirdes et al., 2005). Eine Koexpression von *erg1a*- und *erg1b*-Proteinen konnte ebenfalls in verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen werden. In diesen Zellen wurden Zellzyklus-abhängige Veränderungen der Proteinkonzentrationen festgestellt, die für *erg1a* ausgeprägter war als für *erg1b*. Dadurch kann zu verschiedenen Verhältnissen von *erg1a* zu *erg1b* Untereinheiten kommen (Crociani et al., 2003). Wie in dieser Arbeit demonstriert, beeinflusst das Verhältnis von *erg1a*- zu *erg1b*-Expression die stationäre *erg*-Stromstärke in der Nähe des Ruhepotentials ebenso wie das allgemeine Schaltverhalten. In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass heteromere *erg*-Ströme unterschiedlich auf das Hormon TRH ansprechen. Daher wird die Modulation der Kanäle durch Hormone oder Transmitter stark durch den Anteil der *erg1a*- und *erg1b*-Untereinheiten des Heteromultimers beeinflusst. Es wäre interessant zu erfahren, ob diese Unterschiede auch bei anderen Neurotransmittern vorhanden sind, die *erg*-Ströme modulieren können, wie z.B. Acetylcholin (Hirdes et al., 2004), Adrenalin (Bian et al, 2001) oder Glutamat (Napp, Diplomarbeit).

4.2 Durch PMA verursachte Modulation der erg-Kanäle

PMA zeigt bei akuter Applikation eine ähnliche Wirkung wie TRH. Ein bekannter durch TRH ausgelöster Signalweg führt zur Aktivierung einer PKC, welche durch DAG aktiviert wird und von der Phosphoinositol-Kaskade stammt (Aragay et al., 1992, Martin et al., 1990). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der PLC-PKC Weg für die durch TRH verursachte Reduktion des erg-Stroms in Hypophysenzellen nicht notwendig ist (Bauer et al., 1990, 1994; Barros et al., 1992, 1993; Schäfer et al., 1999; Schledermann et al., 2001; Gomez-Valera et al., 2003b). Dennoch zeigen diese und andere Studien in Oozyten (Thomas et al., 2003), dass erg-Ströme von PMA moduliert werden oder sprechen gar von einer Aktivierung des cAMP-Signalweges durch PMA (Kiehn et al., 1998). In dieser Arbeit wurde daher vergleichend in GH₃/B₆-, MMQ- und CHO-Zellen untersucht, ob durch PMA eine Modulation von erg1-Kanälen hervorgerufen werden kann. Außerdem wurde untersucht, inwiefern sich die verschiedenen erg1-Kanalvarianten in ihrer PMA-bedingten Modulation voneinander unterscheiden.

4.2.1 Einfluss von PMA auf die erg1-Ströme in GH₃/B₆-Zellen

Es wurde untersucht, ob PMA in der Lage ist, die Spannungsabhängigkeit und den Zeitverlauf der Aktivierung der endogenen erg-Kanäle, sowie verschiedener heterolog in GH₃/B₆-Zellen exprimierter erg1-Kanalvarianten zu modulieren.

Bei der Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung ergaben sich starke Parallelen in der Stärke des Effekts von 1 µM PMA und TRH. So wirkten sie in ähnlich abgestufter Reihenfolge. TRH: endogener Strom > *reg1a* >> *reg1a/b* (2:1) und PMA: *reg1a* > endogener erg-Strom >> *reg1a/b* (2:1). Es kam ebenfalls zu einer Reduktion des maximal verfügbaren Stroms bei allen Kanalvarianten, die jedoch mit PMA etwas geringer ausfiel als bei TRH.

Bei den homomeren *reg1b*-Strömen und der Deletionsmutante HERGΔ2-373 konnte PMA keine signifikante Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung auslösen. Es lässt sich somit sagen, dass die *reg1b*-Untereinheiten beim PMA-Effekt ebenso wie beim TRH-Effekt dominant negativ in Hinblick auf die Verschiebung der Aktivierungskurven wirken.

Korrespondierend zu den TRH-Versuchen verlangsamt PMA auch die Aktivierung der erg-Ströme mit abnehmender Stärke (TRH und PMA: *reg1a* > *reg1a/b* (2:1) >> *reg1b*).

Die Aktivierungskinetiken von *reg1b* und von der strukturell ähnlichen Deletionsmutante HERGΔ2-373 ließen sich durch PMA nicht beeinflussen.

Anhand dieser Ähnlichkeiten ist es nahe liegend zu vermuten, dass PMA die natürlicherweise durch TRH angestoßene Signalkaskade anspricht und somit PKC der Second-Messenger von TRH bei der Modulation der erg-Ströme sei. Allerdings sprechen zahlreiche Belege aus der Literatur dagegen, dass die TRH-Wirkung direkt auf die Aktivierung durch PKC zurückzuführen ist. So vermindert die Blockierung oder Downregulation der PKC nicht den TRH-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (Bauer et al., 1990, Schledermann et al., 2001, Gómez-Varela et al., 2003). Möglicherweise tritt daher die Wirkung von PMA auch in diesen Zellen nicht durch die Aktivierung der PKC ein sondern durch Verschiebung des Gleichgewichts einer bereits durch einen Membranrezeptor partiell aktivierten Signalkaskade an unbekannter Stelle.

4.2.2 Einfluss von PMA auf die erg-Ströme in MMQ-Zellen

Die Hauptwirkung von Phorbolestern besteht in der direkten Aktivierung von PKC durch Bindung an die DAG-Bindungsstelle der PKC. Dementsprechend sollten theoretisch die endogenen TRH-Rezeptoren der GH₃/B₆-Zellen für die Wirkung von PMA nicht von Bedeutung sein. Um dies zu überprüfen wurden die gleichen Messungen in MMQ-Zellen durchgeführt, die nicht über endogene TRH-Rezeptoren verfügen, aber dennoch als laktotrope Zelllinie vermutlich über die übrige natürliche Signalkaskade verfügen.

Diese Annahme konnte untermauert werden, indem *reg1a*-Ströme in MMQ-Zellen mit und ohne TRH-Rezeptor exprimiert wurden, wobei TRH nur dann eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (ca. +17 mV) und eine Verlangsamung der Aktivierung verursachte, wenn der Rezeptor koexprimiert wurde. Diese Effekte entsprachen dann denen, die TRH bei heterolog exprimierten *reg1a*-Kanälen in GH₃/B₆-Zellen verursachte. Die Expression des TRH-Rezeptors vervollständigt somit in den MMQ-Zellen die Signalkaskade, welche in der Lage ist, den *erg1*-Strom in der gleichen Art zu modulieren, wie es die native Signalkaskade in GH₃/B₆-Zellen und in nativen laktotropen Zellen in Primärkultur ermöglichte.

Interessanterweise war PMA in MMQ-Zellen nicht in der Lage, die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung der endogenen erg-Ströme zu positiveren Potentialen zu verschieben. Allerdings kam es, anders als bei den GH₃/B₆-Zellen, zu einer Zunahme des maximal verfügbaren Stroms nach PMA-Applikation. Dieses deckt sich mit früheren Beobachtungen, wonach PMA den erg-Strom in laktotropen Primärkulturzellen vergrößern kann (persönliche Mitteilung von C.K. Bauer). Ebenfalls keinen Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung hatte PMA auf die Ströme der heterolog überexprimierten *reg1a*-Kanäle. Bei diesen kam es jedoch zu keiner Zunahme des

maximal verfügbaren Stroms.

Es wurde nun untersucht, ob PMA den überexprimierten *erg1a*-Strom in MMQ-Zellen bei Koexpression des TRH-Rezeptors modulieren kann. Tatsächlich war PMA unter diesen Bedingungen in der Lage, die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung signifikant zu positiveren Potentialen zu verschieben. Jedoch kam es auch hier zu keiner Abnahme des maximal verfügbaren *erg*-Stroms.

Entsprechende Ergebnisse wurden zur Zeitabhängigkeit der Aktivierung erhalten. Auch hierbei verursachte PMA keine Verlangsamung der Aktivierung, weder des endogenen *erg*-Stroms noch des überexprimierten *erg1a*-Stroms. Erst nach Koexpression des TRH-Rezeptors mit *erg1a* in den MMQ-Zellen war PMA in der Lage, die Aktivierung des Stroms signifikant, wenn auch geringfügig, zu verlangsamen.

Diese Beobachtungen stehen entgegen der Annahme, dass für die PMA-induzierte Modulation der *erg*-Ströme kein TRH-Rezeptor benötigt wird. Sie deuten vielmehr darauf hin, dass für die Modulation eines *erg*-Stroms durch PMA eine funktionale Signalkaskade vorhanden sein muss. Sie könnte entweder erst nach der Expression eines Rezeptors ausgebildet werden, oder nach Expression eines Rezeptors zumindest partiell aktiviert werden, ohne welches eine Modulation durch PMA nicht möglich ist. Weiterführende Versuche z.B. mit dem kompetitiven TRH-Rezeptor-Antagonisten Chlorodiazepoxid (Grimbert et al., 1999) könnten Aufschluss darüber geben, ob beispielsweise die alleinige Anwesenheit des TRH-Rezeptors oder seine partielle Aktivierung im ungebundenen Zustand wichtig sind für die Wirksamkeit von PMA. Auch eine Rückkopplung der PMA-aktivierten PKC-Phosphorylierung der TRH-Rezeptor-gekoppelten G-Proteine (Aragay & Quick, 1999) und anschließende Aktivierung untergeordneter Signalkaskaden wäre denkbar.

4.2.3 Einfluss von PMA auf heterolog in CHO-Zellen exprimierte *erg*-Ströme

Während GH_3/B_6 -Zellen sowohl über endogene *erg*-Kanäle als auch über endogene TRH-Rezeptoren verfügen und MMQ-Zellen über endogene *erg*-Kanäle, verfügen die CHO-Zellen weder über *erg*-Kanäle noch über TRH-Rezeptoren. Da in den vorliegenden Experimenten für eine Modulation der *erg*-Kanäle durch TRH oder PMA auch ein funktioneller TRH-Rezeptor benötigt wurde, sollte nun untersucht werden, ob es durch eine Koexpression von *erg*-Kanal und TRH-Rezeptor in CHO-Zellen ebenfalls zur Ausbildung einer funktionellen Signalkaskade kommt, die die Aktivierung des *erg*-Kanals beeinflusst.

PMA führte, wie bei den MMQ-Zellen, bei den heterolog in den CHO-Zellen

überexprimierten *erg1a*-Strömen zu keiner Veränderung in der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung. Auch kam es zu keiner Verlangsamung der Aktivierungsgeschwindigkeit. Allerdings kam es bei einer Koexpression des *erg1a*-Kanal mit dem TRH-Rezeptor in CHO-Zellen, anders als in MMQ-Zellen, zu keiner TRH-Modulation des *erg*-Stroms, weder in Hinsicht auf die Spannungsabhängigkeit noch auf die Aktivierungsgeschwindigkeit. Dieser Unterschied legt nahe, dass eine Modulation der *erg*-Kanäle durch PMA oder TRH nur dann möglich ist, wenn die Zellen bereits über eine endogene, funktionelle Signalkaskade verfügen. Offensichtlich reicht es nicht, nur die beiden Enden des Signalweges, Rezeptor und Kanal, zu exprimieren, sondern das komplexe Zusammenspiel der Signalmoleküle im jeweiligen Expressionssystem ist von essentieller Bedeutung. Dieses Ergebnis betont noch einmal die Wichtigkeit, Signalkaskaden möglichst nicht in künstlichen Expressionssystemen zu untersuchen. Wenn klonale Zellen benützt werden, sollten sie zumindest dem gleichen Gewebe des zu untersuchenden Systems entstammen, wie in dieser Arbeit die somatomammotropen GH₃/B₆-Zellen.

5 Zusammenfassung

Die *erg1a* (HERG) Kaliumkanaluntereinheit und ihre N-terminale Spleißvariante *erg1b* werden in vielen verschiedenen Geweben koexprimiert, und es konnte gezeigt werden, dass die beiden Isoformen heteromultimere *erg*-Kanäle im Herz und im Gehirn bilden. Die Reduktion des *erg1a*-Stroms durch das Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) wurde häufig untersucht, es existierten jedoch bisher noch keine vergleichbaren Daten für *erg1b*. Da TRH und TRH-Rezeptoren in vielen Bereichen des Gehirn exprimiert werden, wurden in dieser Arbeit die biophysikalischen Eigenschaften von homomeren *erg1b*-Kanälen und von heteromeren *erg1a/erg1b*-Kanälen untersucht. Dazu wurden die *erg*-Kanäle in klonalen somatomammotropen Hypophysenzellen der GH₃/B₆-Linie exprimiert. Diese Linie verfügt über endogene *erg*-Kanäle und TRH-Rezeptoren.

Im Vergleich zu *erg1a* verfügen die homomeren *erg1b*-Kanäle über eine deutlich schnellere Deaktivierungskinetik und eine weniger stark ausgeprägte stationäre Inaktivierung. Außerdem befindet sich ihre halbmaximale Aktivierung bei 10 mV positiveren Potentialen. Eine Koexpression der beiden Isoformen führt zu *erg*-Kanälen, die eine intermediäre Deaktivierungskinetik aufweisen. Jedoch wird die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung vom *erg1a* dominiert, während die stationäre Inaktivierung deutlich vom *erg1b* beeinflusst wird.

Die Applikation von TRH induziert eine Reduktion der maximalen *erg* Leitfähigkeit für alle untersuchten *erg1*-Ströme, sie ist jedoch ohne Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit der stationären Inaktivierung. Dennoch unterscheiden sich *erg1b*-Kanäle signifikant in ihrem TRH-induzierten Verhalten von den *erg1a*-Kanälen. Die für *erg1a*-Kanäle typische durch TRH verursachte Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung zu positiveren Potentialen, die deutliche Verlangsamung der Aktivierung und die Beschleunigung der Deaktivierung sind bei *erg1b*-Kanälen nicht vorhanden. Erstaunlicher Weise sind die meisten TRH-induzierten Effekte bei heteromeren *erg1*-Kanälen durch die *erg1b*-Untereinheit dominiert.

PMA löste in GH₃/B₆-Zellen bei allen untersuchten *erg1*-Kanälen die selbe Modulation der *erg*-Ströme aus, die auch durch TRH erzeugt wurde. Es kam zu einer Reduktion des Stroms sowie bei den endogenen und den heterolog exprimierten *erg1a*-Kanälen zu einer deutlichen Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung. Der Einfluss auf die Zeitabhängigkeit der Aktivierung von PMA und TRH war ebenfalls gleich.

In MMQ-Zellen konnte PMA keine Modulation der *erg*-Ströme auslösen. Erst nach heterologer Expression eines TRH-Rezeptors konnten auch in diesen Zellen die PMA-bedingten Effekte beobachtet werden. Die Modulation der verschiedenen *erg*-Ströme

entsprach nun der Modulation durch PMA in GH₃/B₆-Zellen. Für die Wirkung von PMA auf den endogenen erg-Kanal und den heterolog exprimierten erg1-Kanal wurde somit ein funktioneller TRH-Rezeptor benötigt, obwohl PMA entgegen TRH seine Wirkung auch ohne Rezeptor erbringen sollte. In CHO-Zellen war es ebenfalls nicht möglich, mit PMA eine Modulation des heterolog exprimierten rerg1a-Kanals durchzuführen, jedoch konnte auch mit koexprimiertem TRH-Rezeptor mit TRH keine Modulation des rerg1a-Kanals erzielt werden. In diesem Zellsystem war es somit nicht möglich, den erg-Kanal durch TRH oder PMA zu beeinflussen.

Für die TRH- und PMA-bedingte Modulation der erg-Kanäle scheint somit neben dem Vorhandensein einer endogenen Signalkaskade noch das Vorhandensein eines TRH-Rezeptors von Bedeutung zu sein, da im Falle der MMQ-Zellen eine Modulation erst möglich wurde, nachdem ein TRH-Rezeptor koexprimiert wurde. Das könnte darauf hindeuten, dass die endogene Signalkaskade erst bei Vorhandensein eines Rezeptors vollständig ausgebildet oder aktiviert wird.

In CHO-Zellen kommen weder endogene erg-Kanäle noch TRH-Rezeptoren vor, und auch das heterologe Expressieren von erg-Kanälen und TRH-Rezeptoren führt bei CHO-Zellen, anders als bei MMQ-Zellen, nicht zur Ausbildung einer den erg-Strom modulierenden Signalkaskade.

6 Literaturverzeichnis

Aragay, A.M., Katz, A., Simon, M.I. (1992). The $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$ proteins couple the thyrotropin-releasing hormone receptor to phospholipase C in GH₃ rat pituitary cells.

Journal of Biological Chemistry **267**, 24983-24988.

Aragay, A.M., Quick, M.W. (1999). Functional regulation of G alpha16 by protein kinase C.

Journal of Biological Chemistry **274**, 4807-15.

Barros, F., Delgado, L.M., del Camino, D. & de la Peña, P. (1992). Characteristics and modulation by thyrotropin-releasing hormone of an inwardly rectifying K⁺ current in patch perforated GH₃ anterior pituitary cells.

Pflügers Archiv **422**, 31–39.

Barros, F., Mieskes, G., del Camino, D. & de la Peña, P. (1993). Protein phosphatase 2A reverses inhibition of inward rectifying K⁺ currents by thyrotropin-releasing hormone in GH₃ pituitary cells.

FEBS Letters **336**, 433–439.

Barros, F., Gómez-Varela, D., Vilorio, C.G., Palomero, T., Giráldez, T. & de la Peña, P. (1998). Modulation of human erg K⁺ channel gating by activation of a G-protein-coupled receptor and protein kinase C.

Journal of Physiology **511**, 333–346.

Bauer, C.K. & Schwarz, J.R. (2001). Physiology of EAG K⁺ channels.

Journal of Membrane Biology **182**, 1–15.

Bauer, C.K., Meyerhof, W. & Schwarz, J.R. (1990). An inward-rectifying K⁺ current in clonal rat pituitary cells and its modulation by thyrotrophin-releasing hormone.

Journal of Physiology **429**, 169–189.

Bauer, C.K., Davison, I., Kubasov, I., Schwarz, J.R. & Mason, W.T. (1994). Different G proteins are involved in the biphasic response of clonal rat pituitary cells to thyrotropin-releasing hormone.

Pflügers Archiv **428**, 17–25.

- Bauer, C.K., Engeland, B., Wulfsen, I., Ludwig, J., Pongs, O. & Schwarz, J.R. (1998). RERG is a molecular correlate of the inward-rectifying K⁺ current in clonal rat pituitary cells.
Receptors Channels **6**, 19–29.
- Bauer, C.K. (1998). The erg inwardly rectifying K⁺ current and its modulation by thyrotropin-releasing hormone in giant clonal rat anterior pituitary cells.
Journal of Physiology **510**, 63–70.
- Bian, J., Cui, J. & McDonald, T.V. (2001). HERG K⁺ channel activity is regulated by changes in phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate.
Circulation Research **89**, 1168-76.
- Chen, J., Zou, A., Splawski, I., Keating, M.T. & Sanguinetti, M.C. (1999). Long QT syndrome-associated mutations in the Per-Arnt-Sim (PAS) domain of HERG potassium channels accelerate channel deactivation.
Journal of Biological Chemistry **274**, 10113-10118.
- Corrette, B.J., Bauer, C.K. & Schwarz, J.R. (1995). Electrophysiology of anterior pituitary cells.
The Electrophysiology of Neuroendocrine Cells ed. Scherübl, H. & Hescheler, J., pp. 101–143. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Corrette, B.J., Bauer, C.K. & Schwarz, J.R. (1996). An inactivating inward-rectifying K current present in prolactin cells from the pituitary of lactating rats.
Journal of Membrane Biology **150**, 185–195.
- Crociani, O., Guasti, L., Balzi, M., Becchetti, A., Wanke, E., Olivotto, M., Wymore, R.S. & Arcangeli, A. (2003). Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1B isoforms in tumor cells
Journal of Biological Chemistry **278**, 2947–2955.
- Grimberg, H., Zaltsman, I., Lupu-Meiri, M., Gershengorn, M.C. & Oron, Y. (1999). Inverse agonist abolishes desensitization of a constitutively active mutant of thyrotropin-releasing hormone receptor: role of cellular calcium and protein kinase C.
British Journal of Pharmacology **126**, 1097-10.

- Gómez-Varela, D., Barros, F., Vilorio, C.G., Giráldez, T., Manso, D.G., Dupuy, S.G., Miranda, P. & de la Peña, P. (2003a). Relevance of the proximal domain in the amino-terminus of HERG channels for regulation by a phospholipase C-coupled hormone receptor.
FEBS Letters **535**, 125–130.
- Gómez-Varela, D., Giráldez, T., de la Peña, P., Dupuy, S.G., García-Manso, D. & Barros, F. (2003b). Protein kinase C is necessary for recovery from the thyrotropin-releasing hormone-induced r-ERG current reduction in GH₃ rat anterior pituitary cells.
Journal of Physiology **547**, 913–929.
- Guasti, L., Cilia, E., Crociani, O., Hofmann, G., Polvani, S., Becchetti, A., Wanke, E. Tempia, F. & Arcangeli, A. (2005). Expression pattern of the ether-à-go-go-related (ERG) family proteins in the adult mouse central nervous system: evidence for coassembly of different subunits.
Journal of Comprehensive Neurology **491**, 157–174.
- Hirdes W., Schweizer, M., Schuricht, K.S., Guddat, S.S., Wulfsen, I., Bauer, C.K. & Schwarz, J.R. (2005). Fast erg K⁺ currents in rat embryonic serotonergic neurones.
Journal of Physiology **564**, 33–49.
- Hirdes, W., Horowitz, L.F. & Hille, B. (2004). Muscarinic modulation of erg potassium current.
Journal of Physiology **559**, 67-84.
- Horn, R. & Marty, A. (1988). Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method.
Journal of General Physiology **92**, 145–159.
- Jones, E.M., Roti Roti, E.C., Wang, J., Delfosse, S.A. & Robertson, G.A. (2004). Cardiac I_{Kr} channels minimally comprise hERG1a and 1b subunits.
Journal of Biological Chemistry **279**, 44690–44694.

- Kiehn, J., Karle, C., Thomas, D., Yao, X., Brachmann, J. & Kubler, W. (1998). HERG potassium channel activation is shifted by phorbol esters via protein kinase A-dependent pathways.
Journal of Biological Chemistry **273**, 25285-91.
- Lees-Miller, J.P., Kondo, C., Wang, L. & Duff, H.J. (1997). Electrophysiological characterization of an alternatively processed ERG K⁺ channel in mouse and human hearts.
Circulation Research **81**, 719–726.
- London, B., Trudeau, M.C., Newton, K.P., Beyer, A.K., Copeland, N.G., & Gilbert, D.J (1997). Two isoforms of the mouse ether-à-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K⁺ current.
Circulation Research **81**, 870–878.
- Neher, E., & Sakmann, B. (1976). Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres.
Nature **260**, 799-802.
- Martin, T.F.J., Hsieh, K-P., & Porter, B.W. (1990). The sustained second phase of hormone-stimulated diacylglycerol accumulation does not activate protein kinase C in GH₃ cells.
Journal of Biological Chemistry **265**, 7623-7631.
- Marty, A., & Finkelstein, A. (1975). Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin. Differences in its one-sided and two-sided action.
Journal of General Physiology **65**, 515-526.
- McDermott, A.M., Wilikin, G.P., & Dickinson, S.L. (1990). Pharmacological and biochemical comparison of thyrotropin releasing hormone (TRH) and di-methyl proline-TRH on pituitary GH₃ cells.
British Journal of Pharmacology **101**, 615-20.

- Miranda, P., Giráldez, T., de la Peña, P., Manso, D.G., Alonso-Ron, C., Gómez-Varela, D., Domínguez, P. & Barros, F. (2005). Specificity of TRH receptor coupling to G-proteins or regulation of ERG K⁺ channels in GH₃ rat anterior pituitary cells. *Journal of Physiology* **566**, 717–736.
- Sakmann, B., & Neher, E. (1995). Single-Channel Recordings, Second Edition, *Plenum Press New York and London*, Kapitel 1.
- Thomas, D., Zhang, W., Wu, K., Wimmer, A.B., Gut, B., Wendt-Nordahl, G., Kathofer, S., Kreye, V.A., Katus, H.A., Schoels, W., Kiehn, J. & Karle, C.A. (2003). Regulation of HERG potassium channel activation by protein kinase C independent of direct phosphorylation of the channel protein. *Cardiovascular Research* **59**, 14-26.
- Ohya, S., Horowitz, B. & Greenwood, I.A. (2002). Functional and molecular identification of ERG channels in murine portal vein myocytes. *American Journal of Cell Physiol* **283**, C866–C877.
- Ozawa, S., & Sand, O. (1986). Electrophysiology of excitable endocrine cells. *Physiology Review* **66**, 887-951.
- Puck, T.T., Cierciura, S.J. & Robinson, A. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *Journal of Experimental Medicin* **108**, 945-956.
- Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E. & Keating, M.T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* **81**, 299–307.
- Schäfer, R., Wulfsen, I., Behrens, S., Weinsberg, F., Bauer, C.K. & Schwarz, J.R. (1999). The erg-like potassium current in rat lactotrophs. *Journal of Physiology* **518**, 401–416.

- Schledermann, W., Wulfsen, I., Schwarz, J.R. & Bauer, C.K. (2001). Modulation of rat *erg1*, *erg2*, *erg3* and HERG K⁺ currents by thyrotropin-releasing hormone in anterior pituitary cells via the native signal cascade.
Journal of Physiology **532**, 143–163.
- Schönherr, R. & Heinemann, S.H. (1996). Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel.
Journal of Physiology **493**, 635–642.
- Shibasaki, T. (1987). Conductance and kinetics of delayed rectifier potassium channels in nodal cells of the rabbit heart.
Journal of Physiology **387**, 227–250.
- Smith, P.L., Baukrowitz, T. & Yellen, G. (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel.
Nature **379**, 833–836.
- Spector, P.S., Curran, M.E., Zou, A., Keating, M.T. & Sanguinetti, M.C. (1996). Fast inactivation causes rectification of the I_{Kr} channel.
Journal of General Physiology **107**, 611–619.
- Storey, N.M., O'Bryan, J.P. & Armstrong, D.L. (2002). Rac and Rho mediate opposing hormonal regulation of the ether-à-go-go-related potassium channel.
Current Biology , 27–33.
- Sturm, P., Wimmers, S., Schwarz, J.R. & Bauer, C.K. (2005). Extracellular potassium effects are conserved within the rat *erg* K⁺ channel family.
Journal of Physiology **564**, 329–345.
- Tashjian, A.H., Yasamura, Y., Levine, L., Sato, G.H. & Parker, M. (1968). Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone.
Endocrinology **82**, 342-352.
- Trudeau, M.C., Warmke, J.W., Ganetzky, B. & Robertson, G.A. (1995). HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family.
Science **269**, 92–95.

- Viloria, C.G., Barros, F., Giráldez, T., Gómez-Varela, D. & de la Peña, P. (2000). Differential effects of amino-terminal distal and proximal domains in the regulation of human erg K⁺ channel gating. *Biophysical Journal* **79**, 231–246.
- Wang, S., Liu, S., Morales, M.J., Strauss, H.C. & Rasmusson, R.L. (1997). A quantitative analysis of the activation and inactivation kinetics of HERG expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology* **502**, 45–60.
- Wang, J., Trudeau, M.C., Zappia, A.M. & Robertson, G.A. (1998). Regulation of deactivation by an amino terminal domain in human ether-à-go-go-related gene potassium channels. *Journal of General Physiology* **112**, 637–647.
- Wang, J., Myers, C.D. & Robertson, G.A. (2000). Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K⁺ channels. *Journal of General Physiology* **115**, 749–758.
- Warmke, L., Drysdale, R. & Ganetzky, B. (1991). A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. *Science* **252**, 1560-1562.
- Warmke, J.W. & Ganetzky, B. (1994). A family of potassium channel genes related to *eag*. *Drosophila* and mammals. *Proceeding of the National Academy of Science USA* **91**, 3438–3442.
- Weinsberg, F., Bauer, C.K. & Schwarz, J.R. (1997). The class III antiarrhythmic agent E-4031 selectively blocks the inactivating inward-rectifying potassium current in rat anterior pituitary tumor cells (GH₃/B₆ cells). *Pflügers Archiv* **434**, 1–10.
- Wimmers, S., Wulfsen, I., Bauer, C.K. & Schwarz, J.R. (2001). Erg1, erg2 and erg3 K channel subunits are able to form heteromultimers. *Pflügers Archiv* **441**, 450–455.

Wimmers, S., Bauer, C.K. & Schwarz, J.R. (2002). Biophysical properties of heteromultimeric erg K⁺ channels.

Pflügers Archiv **445**, 423–430.

Wulfsen, I., Hauber, H.P., Schiemann, D., Bauer, C.K. & Schwarz, J.R. (2000) Expression of mRNA for voltage-dependent and inward-rectifying K channels in GH₃/B₆ cells and rat pituitary.

Journal of Neuroendocrinology **12**, 263–272.

7 Abkürzungen

cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CCK	Cholecystokinin
CHO	Zelllinie aus dem Ovarialtumor des chinesischen Hamsters
cNBD	zyklisches Nukleotid
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidphosphat
$E_{0,5}$	Membranpotential, bei dem ein Strom halbmaximal aktiviert ist
EAG	„Ether-á-go-go“-Gen
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGFP	grün fluoreszierendes Protein („Enhanced-Green-Fluorescent-Protein“)
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N,N-tetraessigsäure
GH ₃ /B ₆	somatomammotrophe Zelllinie (Growth Hormone, 3.Klon, Linie B6)
MΩ	MegaOhm
Ham's	Nährmedium von Gibco/BRL
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HERG	Humanes „ether-à-go-go-related-gene“
hPa	Hektopascal
$I_{K,IR}$	Einwärtsgerichteter Kaliumstrom in GH3/B6 - Zellen
I_{Kr}	schnelle Komponente des „delayed rectifier“-Kaliumstroms im Herzen
IP3	myo-Inositol 1,4,5-trisphosphat
K_v	spannungsabhängige Kaliumkanäle
MMQ	neuroendokrine Zelllinie die ausschließlich Prolaktin sekretiert
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
P	Porenregion
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIP2	Phosphatidyl-D-myo-inositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRL	Prolaktin

rerq	Ratten „ether-à-go-go-related-gene“
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Transmembrandomänen
S.E.M.	Standardfehler (standard error of the mean)
siRNA	silencer Ribonukleinsäure
SST	Somatostatin
Ta _{Deakt}	Zeitkonstante der Deaktivierung
TRH	Thyreotropin-Releasing Hormon
TTX	Tetrodotoxin
Upm	Umdrehungen pro Minute
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt habe und wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich versichere auch, dass ich die Inanspruchnahme persönlicher Hilfen namentlich aufgeführt habe.

Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.
