

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Pharmakologie für Pharmazeuten
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Michael Korth

Regulation des BK-Kanals durch die Proteinkinase C

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
vorgelegt im Department Chemie
der Universität Hamburg

von

Emine Utku

Hamburg 2009

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Michael Korth
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Peter Heisig

Disputation: 11.12.2009

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Kaliumselektive Kanäle	2
1.2	Ca ²⁺ -aktivierte Kaliumkanäle	4
1.2.1	SK- und IK-Kanäle	4
1.2.2	BK-Kanäle	4
1.3	Die Proteinkinase C	10
1.4	Wissenschaftliche Fragestellung	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Material	17
2.1.1	Verwendete Substanzen, Enzyme, Vektoren und Zelllinien	17
2.1.2	Verbrauchsmaterial	20
2.1.3	Verwendete Geräte	20
2.1.4	Lösungen und Puffer	22
2.1.5	Primer Sequenzen	23
2.1.6	Programme	24
2.2	Methoden	25
2.2.1	Molekularbiologische Standardmethoden	25
2.2.1.1	DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen	25
2.2.1.2	Agarosegelelektrophorese	25
2.2.1.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
2.2.1.4	Ligation von DNA-Fragmenten	26
2.2.1.5	Transformation von Bakterien	26
2.2.1.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	27
2.2.1.7	Konzentrationsbestimmung von DNA	27
2.2.2	Zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)	28
2.2.2.1	Overlap-PCR	29
2.2.2.2	Abgeleitete Form der QuikChange Site-Directed Mutagenesis Methode	33
2.2.3	Zellbiologische Methoden	36
2.2.3.1	Kultivierung von Zelllinien und Aussaat von Zellen	36
2.2.3.2	Transiente Transfektion von Zellen	36
2.2.3.3	Tiere, Gewinnung von Trachealzellen, Einzelzellisolierung	37
2.2.4	Elektrophysiologische Methoden	38
2.2.4.1	Die Patch-Clamp-Technik	38
2.2.4.2	Statistik und Auswertung der Daten	43
2.2.4.3	Bad- und Pipettenlösungen	45
3	ERGEBNISSE	48
3.1	Elektrophysiologische Charakterisierung des BK _A -Kanals	48
3.2	Regulation des BK _A -Kanals durch die Proteinkinase C	53

3.2.1	Wirkung von Phorbol ester auf den BK _A -Strom bei unterschiedlichen Ca ²⁺ -Konzentrationen	53
3.2.2	Die PMA-induzierte Hemmung des I _{BK} wird durch PKC-Inhibitoren aufgehoben.....	56
3.2.3	Effekte der katalytischen Untereinheit der PKC auf I _{BK}	58
3.3	Ser ¹¹⁵¹ ist für die PKC-induzierte Hemmung essentiell.....	62
3.4	Ser ¹¹⁵¹ des BK _A -Kanals liegt bereits konstitutiv phosphoryliert vor.....	67
3.5	Neben Ser ¹¹⁵¹ ist auch Ser ⁶⁹⁵ für die PKC-abhängige Hemmung des BK _A -Kanals essentiell	74
3.6	Die Phosphorylierung von Ser ⁶⁹⁵ durch die PKC ist abhängig von der Phosphorylierung von Ser ¹¹⁵¹	78
3.7	Die PKG- und PKA-induzierte Aktivierung des BK _A -Kanals wird in Gegenwart der PKC aufgehoben.....	81
3.8	Untersuchungen zur Stöchiometrie der BK-Kanal-Phosphorylierung durch die PKC	86
3.9	Regulation des BK-Kanals im nativen System	91
4	DISKUSSION	99
4.1	Regulation des BK-Kanals durch die PKC im heterologen Expressionssystem.....	101
4.2	Stöchiometrie der PKC-Phosphorylierung	107
4.3	Regulation des BK-Kanals im nativen System	109
5	ZUSAMMENFASSUNG	113
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	116
7	ANHANG	130
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	130
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	134
7.3	Tabellenverzeichnis.....	136
7.4	Vektor-Karten	137
7.5	Abbildungen	139
7.6	Substanzen mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsratschlägen.....	142
7.7	Lebenslauf.....	143
7.8	Eidesstattliche Erklärung	144
7.9	Verzeichnis der wissenschaftlichen Arbeiten.....	145
7.10	Danksagung	146

1 EINLEITUNG

Die Zelle stellt die kleinste Grundeinheit aller Lebewesen dar. Jede Zelle ist von einer hydrophoben Membran aus Lipiden umschlossen, die das Innere von der Umgebung trennt. Während lipidlösliche, unpolare Substanzen durch die Membran diffundieren können, ist die Zellmembran impermeabel für geladene Teilchen (Ionen). Um trotzdem Austauschvorgänge von Ionen zu ermöglichen, sind entsprechende Transportmechanismen notwendig. Der Transport durch die Membran hindurch erfolgt u.a. durch Ionenpumpen und Ionenkanäle, die die ganze Membran durchspannen. Ionenpumpen transportieren Ionen unter ATP-Verbrauch. Das zu transportierende Ion wird auf einer Seite der Zellmembran gebunden und nach einer Konformationsänderung der Ionenpumpe auf der anderen Seite der Zellmembran freigesetzt. Hierbei handelt es sich um einen aktiven Transport. Ionenkanäle bilden dagegen wassergefüllte Poren, die sich durch eine unterschiedliche Selektivität für einzelne Ionenarten auszeichnen. Der Transport von Ionen durch den Ionenkanal erfolgt passiv entsprechend dem elektrochemischen Gradienten und ohne Energieverbrauch. Aufgrund der Ionenselektivität lassen sich die Ionenkanäle in Natrium-, Kalzium-, Kalium-, Chlorid- und unselektive Kationenkanäle klassifizieren. Da die Zellmembran nicht für alle Ionen gleichermaßen permeabel ist, und darüber hinaus deren Konzentrationen im Cytoplasma und im Extrazellulärraum nicht gleich sind, kommt es zu einer Verschiebung des Ladungsverhältnisses zwischen Innen- und Außenseite der Membran. Dieser Ladungsunterschied zwischen innerem und äußerem Milieu wird als Membranpotential bezeichnet. Eine große Anzahl zellulärer Prozesse wird über die kontrollierte Änderung des Membranpotentials gesteuert. In den letzten Jahren ist es mit Hilfe biophysikalischer Methoden gelungen die Eigenschaften von Ionenkanälen wie die Aktivierung und Inaktivierung zu untersuchen (Ashcroft, 1999, Hille, 2001).

1.1 Kaliumselektive Kanäle

Kaliumkanäle werden in nahezu allen erregbaren und nicht-erregbaren Zellen exprimiert. Sie spielen eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Prozessen zu denen unter anderem die Kontrolle der Zellproliferation in T-Lymphozyten, die Weiterleitung von Aktionspotentialen, die Insulinsekretion pankreatischer β -Zellen oder die Regulation des Salz- und Wasserhaushalts in Nierenzellen gehören. Viele Kaliumkanäle setzen sich aus vier porenbildenden α -Untereinheiten zusammen, die ihrerseits mit verschiedenen β -Untereinheiten assoziieren können. β -Untereinheiten können im Gegensatz zu α -Untereinheiten keinen funktionellen Kanal bilden. Die bisher bekannten α -Untereinheiten weisen bestimmte gemeinsame Strukturmerkmale auf. Sie zeichnen sich durch mindestens eine Porenregion (P), die den Ionendurchtritt und die Selektivität reguliert und zwei flankierende Transmembransegmenten (TM) aus. Die Superfamilie der Kaliumkanäle kann aufgrund dieses Strukturmotivs und weiterer Transmembransegmente in 4 Gruppen aufgeteilt werden. Es gibt Kaliumkanäle mit 2 Transmembransegmenten und einer Pore (2TM-1P; meist einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle) und mit 6 Transmembransegmenten und einer Pore (6TM-1P). Zu den 6TM-1P-Kanälen gehören die spannungsabhängigen Kaliumkanäle vom Shaker-Typ, die EAG-Kaliumkanäle und die KCNQ-Kanäle (Pongs, 1999). Neben Kaliumkanälen mit einer Porenregion pro α -Untereinheit existieren auch Kaliumkanäle mit zwei Porenregionen, so genannte 2-P Kanäle. Die Vertreter dieser Kanalklasse weisen vier Transmembransegmente und zwei Porenregionen auf (4TM-2P; z.B. TWIK-Kanäle). Es existieren auch Varianten, die sich durch das Vorhandensein von acht Transmembransegmenten und zwei Porenregionen auszeichnen (8TM-2P; z.B. TOK-Kanäle). Bei allen Mitgliedern der Gruppe 6TM-1P befindet sich die Porenregion zwischen den Transmembransegmenten S5 und S6. Zusätzlich werden sie alle durch Depolarisation aktiviert und besitzen in ihren S4 Transmembransegment eine regelmäßige Abfolge positiv geladener Aminosäuren, die als Spannungssensor fungieren (Sewing et al., 1996). Der N- und C-Terminus ist in der Regel cytoplasmatisch

lokalisiert. Eine Ausnahme bildet der spannungsgesteuerte und Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit (BK-Kanal). Dieser Kanal besitzt ein zusätzliches siebtes Transmembransegment (7TM-1P), so dass der N-Terminus extrazellulär lokalisiert ist (Meera et al., 1997).

In Abbildung 1.1 sind die verschiedenen Kaliumkanäle schematisch dargestellt.

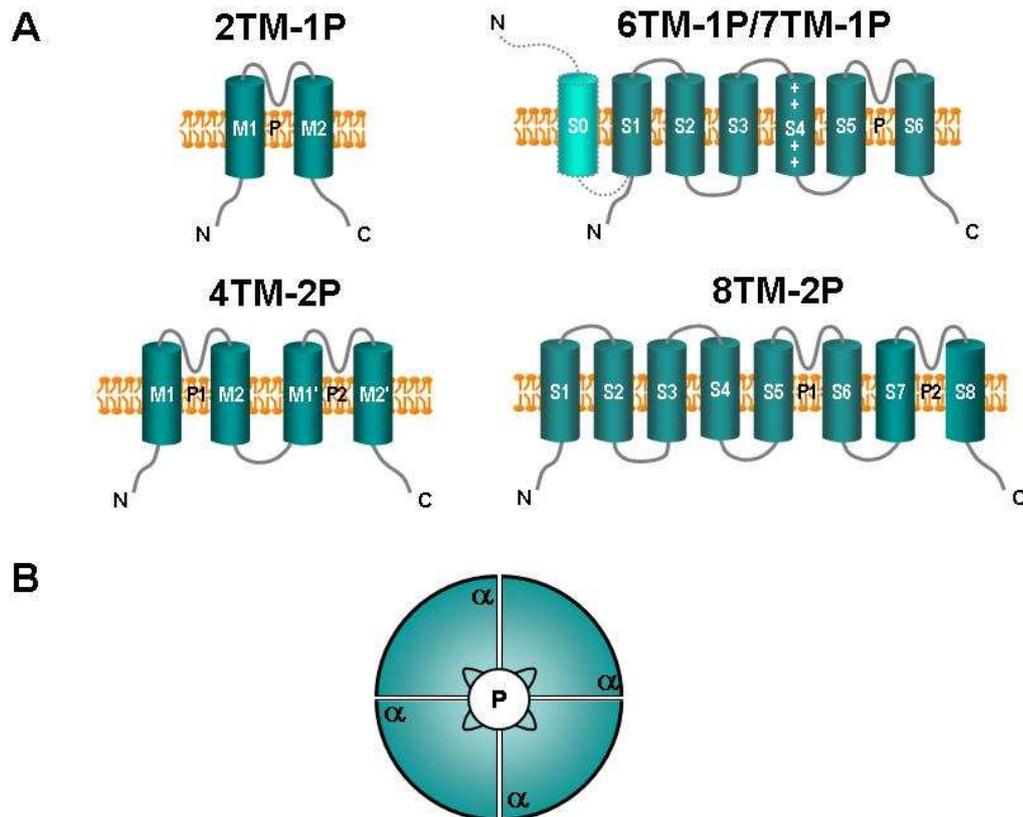


Abbildung 1.1 Topologiemodelle der vier Hauptklassen von Kaliumkanälen

A: 2TM-1P-Kanäle (z. B. K_{ir} -Kanäle); 6TM-1P-Kanäle (z. B. K_V -Kanäle); 7TM-1P-Kanäle (BK-Kanäle); 4TM-2P-Kanäle (z.B. TWIK-Kanäle) und 8TM-2P-Kanäle (z.B. TOK-Kanäle) Die Transmembran(TM)-segmente (bezeichnet mit „M“ oder „S“ und einer Nummer) und die „Porenregion“ (P) sind eingezeichnet. In den 6TM-1P-/7TM-1P-Kanälen sind die positiven Ladungen im S4-Segment, die als Spannungssensor dienen, hervorgehoben. B: Vier α -Untereinheiten bilden einen funktionellen Kaliumkanal (modifiziert nach Choe, 2002).

1.2 Ca²⁺-aktivierte Kaliumkanäle

Ca²⁺-aktivierte Kaliumkanäle werden durch einen Anstieg der freien intrazellulären Ca²⁺-Konzentration aktiviert. Aufgrund der lebensnotwendigen Funktionen des Ca²⁺ sind diese Kanäle in nahezu allen Geweben mehrzelliger Organismen zu finden. Sie werden aufgrund ihrer Einzelkanalleitfähigkeiten in drei Unterfamilien gegliedert, die BK- (*big conductance*), IK- (*intermediate conductance*) und SK-Kanäle (*small conductance*).

1.2.1 SK- und IK-Kanäle

SK-Kanäle besitzen Einzelkanalleitfähigkeiten zwischen 10 und 40 pS und sind in erregbaren Zellen für die langsame Nachhyperpolarisation verantwortlich, die auf Aktionspotentiale folgt (Vergara et al., 1998). Bisher konnten drei Typen von SK-Kanälen identifiziert werden (SK1, SK2, SK3), die alle eine große strukturelle Ähnlichkeit mit den K_v-Kanälen aufweisen, aber dennoch nicht spannungsabhängig sind. Sie werden selektiv durch das Bienentoxin Apamin gehemmt (Köhler et al., 1996).

IK-Kanäle (SK4) besitzen eine Einzelkanalleitfähigkeit zwischen 20 und 80 pS (Latorre et al., 1989) und werden in ihrer Aktivität durch das Antimykotikum TRAM-34 (Wulff et al., 2001) und das Skorpiongift Charybdotoxin gehemmt (Jensen et al., 1998), während Apamin unwirksam ist. Sie kommen überwiegend in Blut- und Endothelzellen (Grygorczyk and Schwarz, 1983) und in der proliferierenden glatten Muskulatur vor (Joiner et al., 1997).

1.2.2 BK-Kanäle

BK-Kanäle (*Slo*; KCNMA1) unterscheiden sich von den anderen Ca²⁺-aktivierten Kaliumkanälen durch ihre sehr hohe Einzelkanalleitfähigkeit von 100 bis 250 pS. Sie werden durch Depolarisation der Zellmembran und Erhöhung der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration aktiviert, d.h. durch Mechanismen, die eine wichtige Rolle bei der Kontraktion glatter Muskelzellen spielen. Durch den über den BK-Kanal generierten

K⁺-Auswärtsstrom werden zellaktivierende Signale im Sinne einer negativen Rückkopplung gehemmt, die in glatten Muskelzellen zur Relaxation führt (Brayden et al., 1992). BK-Kanäle werden durch das Skorpiongift Iberiotoxin selektiv gehemmt (Galvez et al., 1990). Aus Versuchen an Mäusen, bei denen das Gen für die porenbildende α -Untereinheit des BK-Kanals deletiert wurde, ist bekannt, dass ihr Fehlen multiple Störungen wie Hyperaldosteronismus mit Bluthochdruck (Sausbier et al., 2005), zerebelläre Ataxie (Sausbier et al., 2004), progrediente Schwerhörigkeit (Ruttiger et al., 2004), Dranginkontinenz (Meredith et al., 2004), und erektile Dysfunktion (Werner et al., 2005) hervorruft. Inzwischen wurde auch beim Menschen eine Mutation in der α -Untereinheit des BK-Kanals entdeckt, die Ursache neurologischer Erkrankungen wie generalisierte Epilepsie mit paroxysmaler Dyskinesie ist (Du et al., 2005). Diese Befunde unterstreichen die große physiologische Bedeutung dieses Kanaltyps.

Der BK-Kanal ist aus einem Komplex von zwei Untereinheiten aufgebaut, der porenbildenden α - und der modulatorischen β -Untereinheit. Die erste BK- α -Untereinheit wurde aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als *Slowpoke*-Gen kloniert (*dSlo*, Atkinson et al., 1991) und kurz darauf in *Xenopus* Oozyten elektrophysiologisch nachgewiesen (Adelman et al., 1992). Der Name (*slowpoke* = Trödler, Langweiler) leitet sich von dem entsprechenden Verhalten der *Drosophila*-Mutante ab. Nachfolgend wurden Homologe aus verschiedenen Organismen wie Maus (*mSlo*, Butler et al., 1993) und Mensch (*hSlo*, Dworetzky et al., 1994) charakterisiert. Die α -Untereinheit wird von nur einem Gen kodiert, während gewebespezifisch bereits vier verschiedene Gene der β -Untereinheiten identifiziert werden konnten (Orio et al., 2002). β -Untereinheiten werden im Gegensatz zur α -Untereinheit nicht ubiquitär exprimiert. Die β_1 -Untereinheit wird hauptsächlich in der glatten Muskulatur von Aorta, Magen, Duodenum, Ileum, Colon, Blase und Uterus exprimiert (Knaus et al., 1994, Vogalis et al., 1996). Durch die Koexpression der α - und der β_1 -Untereinheiten konnte in heterologen Expressionsexperimenten eine Erhöhung der Ca²⁺- und der Spannungssensitivität und eine Verlangsamung der Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik beobachtet werden (Dworetzky et al., 1996). Die β_2 -

Untereinheit wird hauptsächlich in chromaffinen Zellen und im Gehirn exprimiert (Wallner et al., 1999, Xia et al., 1999), während die β_3 -Untereinheit im Hoden, im Pankreas, der Niere, der Hypophyse und im Gehirn zu finden ist (Xia et al., 2000). Im Gegensatz zu den anderen β -Untereinheiten senkt die Koexpression mit β_4 die Ca^{2+} -Sensitivität des BK-Kanals (Brenner et al., 2000, Meera et al., 2000). Diese Untereinheit wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert. Die α -Untereinheit besteht aus sieben Transmembransegmenten (S0-S6) und vier weiteren, cytosolisch vorliegenden hydrophoben Segmenten (S7-S10). Im Vergleich zu anderen spannungsabhängigen Kaliumkanälen (K_v) besitzt die α -Untereinheit des BK-Kanals ein siebtes Transmembransegment (S0), was dazu führt, dass der N-Terminus der α -Untereinheit extrazellulär liegt. Dieses Segment fungiert vermutlich als Verbindungsdomäne zur regulatorischen β_1 -Untereinheit (Morrow et al., 2006). Zwischen S5 und S6 befindet sich die Porenregion (P). Die Kanalpore ist K^+ -selektiv und besitzt die in allen Kaliumkanälen hoch konservierte Signatursequenz „TVGYG“. Das S4 Segment enthält eine charakteristische Arginin-Abfolge in jeder dritten Position und fungiert als Spannungssensor. Dem S6 Segment folgen die Segmente S7-S10, die zwei Drittel des gesamten Proteins ausmachen (Meera et al., 1997). Die regulatorische β -Untereinheit besteht aus zwei transmembranären Segmenten, die durch einen extrazellulären Bereich miteinander verbunden sind. Der N- und C-Terminus liegen dabei auf der cytoplasmatischen Seite. Ein funktioneller BK-Kanal besteht aus vier identischen α -Untereinheiten und aus vier weiteren regulatorischen β -Untereinheiten (Knaus et al., 1994, Kaczorowski et al., 1996). Es gibt Hinweise darauf, dass für die Ca^{2+} -abhängige Regulation des BK-Kanals neben einem Asparaginsäure-reichen Sequenzmotif (-QDDDDDP-), das als „ Ca^{2+} -bowl“ bezeichnet wird, auch andere regulatorische Sequenzen im C-Terminus existieren. Dazu gehören zwei besondere Strukturen, die als „RCK“-Domänen bezeichnet werden (RCK1 und RCK2). RCK steht hierbei für „regulators of conductance of K^+ -channels“ (Regulatoren der Kaliumleitfähigkeit). Diese haben einen entscheidenden Einfluss auf den Öffnungsmechanismus des Kanals (Jiang et al. 2001, Xia et al., 2002, Piskorowski and Aldrich, 2002). Des Weiteren konnte gezeigt

werden, dass durch Variation der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung des BK-Kanals erst bei ≥ 100 nM beginnt (Ca^{2+} -abhängiger Zustand), während bei Ca^{2+} -Konzentrationen < 100 nM der Kanal ausschließlich spannungsabhängig öffnet, und eine funktionelle Entkopplung von der regulatorischen β -Untereinheit erfolgt (Meera et al., 1996).

Um den BK-Kanal Ca^{2+} -abhängig zu aktivieren bedarf es einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. So wird z.B. in glatten Muskelzellen durch die spontane Öffnung Ryanodin-sensitiver Kalziumkanäle (Ryanodinrezeptoren, RyR) Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) freigesetzt (Ca^{2+} -Sparks, Cheng et al., 1993, Nelson et al., 1995). Anteile des terminalen SR glatter Muskelzellen kommen der äußeren Zellmembran so nahe, dass zwischen Zellmembran und Membran des SR ein dünner Spalt mit einer Breite von 12 bis 20 nm entsteht (Gollasch et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass durch Ca^{2+} -Sparks in diesem diffusionslimitierten Spalt kurzfristig Ca^{2+} -Konzentrationen von 10 - 100 μM erreicht werden können (Jaggar et al., 2000). Diese Konzentrationen liegen im Aktivierungsbereich des BK-Kanals. Der durch die Aktivierung des BK-Kanals entstehende K^+ -Ausstrom wird auch als STOC (spontaneous transient outward current) bezeichnet (Benham and Bolton, 1986). Dies führt zu einer Membranhyperpolarisation und eventuell zum Schließen spannungsabhängiger Kalziumkanäle (negative Rückkopplung). In Abbildung 1.2 ist der schematische Aufbau und der Aktivierungszyklus eines BK-Kanals dargestellt.

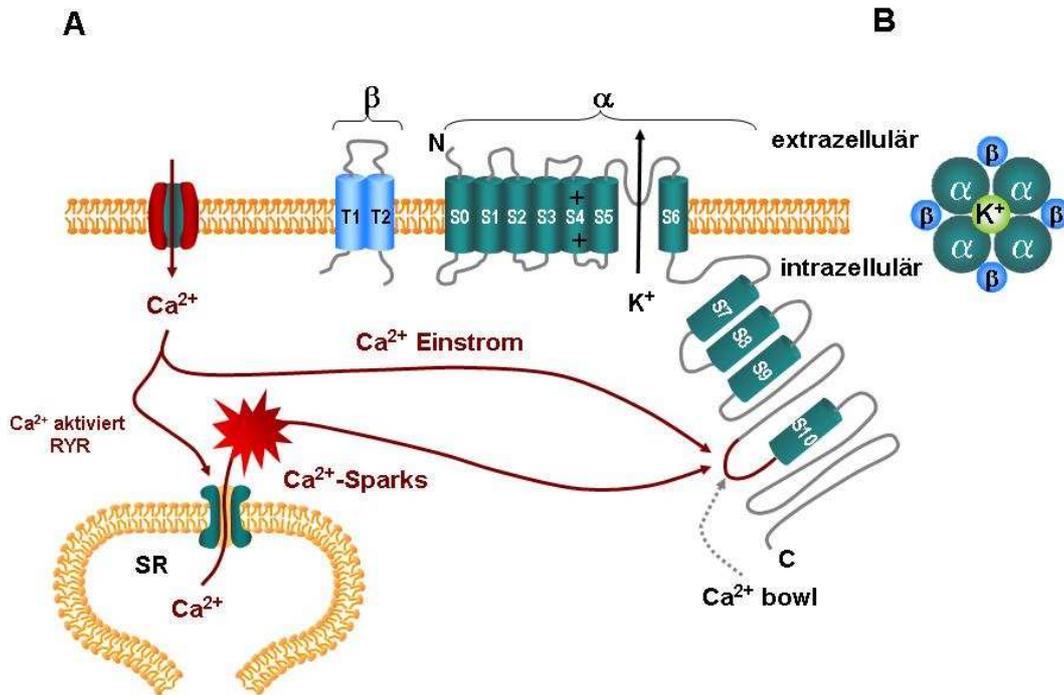


Abbildung 1.2 Molekulare Struktur der α - und β -Untereinheit des BK-Kanals und seine Aktivierung

A: Schematische Darstellung in der Seitenansicht der einzelnen Untereinheiten des BK-Kanals. Die β -Untereinheit besteht aus zwei transmembranär angeordneten Segmenten. Die α -Untereinheit besteht aus sieben (S0-S6) transmembranären und vier intrazellulären (S7-S10) Segmenten. Das Segment S4 dient als Spannungssensor. Ca^{2+} aktiviert Ryanodinrezeptoren (RyR) am sarkoplasmatischen Retikulum (SR), was die Freisetzung von Ca^{2+} induziert (Ca^{2+} -Sparks). Durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird der BK-Kanal aktiviert und K^+ fließt aus der Zelle. Der K^+ -Ausstrom führt zur Hyperpolarisation der Zellmembran und eventuell zur Inaktivierung von Kalziumkanälen. B: Schematische Aufsicht auf einen funktionellen BK-Kanal, bestehend aus vier α -Untereinheiten und vier β -Untereinheiten.

Neben der Depolarisation und Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration existieren noch weitere Steuerungsmechanismen, die den BK-Kanal regulieren. Dazu gehört die Expression von Spleißformen (Tseng-Crank et al., 1994, Xie and McCobb, 1998, Shipston, 2001, Tian et al., 2001, Zhou et al., 2001), die Expression von regulatorischen β -Untereinheiten (Dworetzky et al., 1996, Wallner et al., 1999, Brenner et al., 2000, Xia et al., 2000, Lingle et al., 2001), Phosphorylierung durch Serin-/Threonin-Proteinkinasen und Tyrosinkinasen (Ling et al., 2000,

Schubert and Nelson, 2001), Interaktionen mit G-Proteinen (Zhou et al., 2008) und die Bildung von Makrokomplexen mit vielen transmembranären und cytosolischen Proteinen (Lu et al., 2006). Der Regulation des BK-Kanals durch Proteinkinasen kommt eine wichtige physiologische Bedeutung zu, da Proteinkinasen bei einer Vielzahl von Signaltransduktionsvorgängen beteiligt sind. Sie übertragen Phosphatgruppen auf andere Proteine, wodurch deren biologische Eigenschaften verändert werden. Im C-Terminus des Kanalproteins sind zahlreiche putative Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen vorhanden, so z.B. für die cAMP- (PKA) und cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), für Tyrosinkinasen und für die Proteinkinase C (PKC). Für die PKA, PKG und *Src* Tyrosinkinase konnte eine direkte Phosphorylierung des BK-Kanals nachgewiesen werden (Alioua et al., 1995, Alioua et al., 1998, Nara et al., 1998, Fukao et al., 1999, Zhou et al., 2001, Ling et al., 2000, Tian et al., 2004). Ferner konnte gezeigt werden, dass bereits geringe Unterschiede im C-Terminus des BK-Kanals zu einer veränderten Regulation durch dieselbe Proteinkinase führen kann. So wurden in einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe drei Spleißformen (Isoformen) des BK-Kanals aus der Rindertrachea kloniert BK_A, BK_B und BK_C, die sich in ihrem C-Terminus voneinander unterscheiden (Zhou et al., 2001). Die Isoform BK_A entspricht der „ZERO“-Mutante und weist kein zusätzliches Insert auf. BK_B weist Unterschiede in den letzten sechs C-terminalen Aminosäuren gegenüber der A-Form auf, und BK_C ist eine trunke Form der die letzten 23 Aminosäuren fehlen, und die sich zusätzlich in den letzten drei Aminosäuren von der A-Form unterscheidet. Während die Isoformen BK_A und BK_B durch die PKG aktiviert wurden, zeigte die verkürzte Isoform BK_C keine Wirkung auf die PKG und konnte ausschließlich durch die PKA aktiviert werden.

In den meisten bisher untersuchten glattmuskulären Geweben besitzt sowohl die PKA als auch die PKG aktivierende Eigenschaften auf den BK-Kanal (Übersicht bei Schubert and Nelson, 2001). Für die PKC wurde demgegenüber eine hemmende Wirkung auf den BK-Kanal beobachtet. Minami et al. (1993) zeigte mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik an kultivierten glatten Muskelzellen aus Koronararterien des Schweins, dass eine

Aktivierung der PKC durch Applikation von Phorbolestern wie 4 β -Phorbol 12-myristat, 13-acetat (PMA), Diacylglycerol-Analoga wie 1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol (OAG) oder der direkten Applikation des konstitutiv aktiven PKC-Fragmentes zu einer Hemmung des BK-Kanals führt. Shipston und Armstrong haben 1996 an Tumorzellen aus der Rattenhypophyse (GH₄C₁ Zellen) gezeigt, dass die Aktivierung der PKC zu einer Abnahme von BK-Strömen führt. Weitere Untersuchungen die an Neuronen des Hippocampus (Doerner et al., 1988), an verschiedenen Gefäßmuskelzellen der Ratte (Schubert et al., 1999, Barman et al., 2004, Taguchi et al., 2000), und an corticotrophen Hypophysenzellen der Maus (AtT20 D16:16 Zellen) (Tian et al., 1999) durchgeführt wurden, zeigten ebenfalls eine Hemmung des BK-Kanals durch Aktivierung der PKC. Während die Hemmung des BK-Kanals durch die PKC gut untersucht ist, sind die für die Hemmung verantwortlichen molekularen Mechanismen noch unbekannt.

1.3 Die Proteinkinase C

Die Proteinkinase C (PKC) gehört zur Gruppe der Serin-/Threonin-spezifischen Kinasen. Sie spielt eine zentrale Rolle bei intrazellulären Signaltransduktionsvorgängen und bei der Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose (Weinstein, 1988, Ron und Kazanietz, 1999). Sie katalysiert den Transfer von Phosphat aus ATP auf Aminosäuren in Zielproteinen mit den folgenden Konsensussequenzen (Kennelly and Krebs, 1991):

R/K₁₋₃, X₀₋₂-S*/T*-X₀₋₂, R/K₁₋₃

S*/T*-X₀₋₂, R/K₁₋₃ oder

R/K₁₋₃, X₀₋₂-S*/T*

R=Arginin; K=Lysin; S=Serin; T=Threonin; X=beliebige Aminosäure; * = Phosphorylierungsstelle.

Bis heute konnten in Säugern 11 Isoformen isoliert werden, die von 10 verschiedenen Genen kodiert werden. Sie werden als PKC- α , β I, β II, γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ι und λ bezeichnet, wobei PKC- λ das Maus-Homolog von PKC- ι ist (Mellor and Parker, 1998, α , β , γ : Parker et al., 1986, Coussens et al., 1986,

δ, ε, ζ; Ono et al., 1987, η; Osada et al., 1990, θ; Osada et al., 1992, ι/λ; Selbie et al., 1993). Die Isoformen βI und βII entstehen aus demselben Gen durch alternatives Spleißen (Coussens, 1987). Alle Mitglieder der PKC-Familie bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette. Sie werden aufgrund ihrer Struktur und Kofaktorregulation in drei Gruppen unterteilt: Die konventionellen (cPKC), neuen (nPKC) und atypischen PKC's (aPKC). Die konventionellen PKC's (cPKC) zu denen die Isoformen α, βI, βII und γ zählen, sind die am besten untersuchten Isoformen. Sie werden durch Ca^{2+} , Phosphatidylserin, Diacylglycerol (DAG) oder Phorbolster wie Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) aktiviert (Newton, 1997). Phorbolster und Diacylglycerol konkurrieren dabei um dieselbe Bindungsstelle. Im Gegensatz zu DAG können Phorbolster die PKC jedoch bei weitaus geringeren Ca^{2+} -Konzentrationen aktivieren (Castagna, 1982). Den neuen PKC's (nPKC) zu denen die Isoformen δ, ε, η und θ zählen, fehlen die zur Ca^{2+} -Bindung notwendigen Aspartatreste (Sossin and Schwartz, 1993). Sie zeigen ihre volle enzymatische Aktivität in Anwesenheit von Phosphatidylserin und DAG (Ono, 1988).

Zu den atypischen PKC's (aPKC) gehören die Isoformen ι, (Maushomolog PKC-λ) und ζ. Diese Isoformen werden durch Phosphatidylserin aktiviert (Toker, 1998, Johnson, 2000) und sind unabhängig von Ca^{2+} und DAG. Die ursprünglich zur Gruppe der atypischen Isoformen gezählte PKC-μ, auch bekannt als Proteinkinase D (PKD) wird inzwischen aufgrund der strukturellen Unterschiede nicht mehr zu den PKC-Isoformen gezählt (Rozengurt et al., 2005). Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die PKC-Isoformen mit ihren jeweiligen Kofaktoren:

PKC-Isoformen	Kofaktoren
c-PKC (α, βI, βII und γ)	Ca^{2+} , Phosphatidylserin, DAG
nPKC (δ, ε, η und θ)	Phosphatidylserin, DAG
aPKC (ζ und ι)	Phosphatidylserin

Tabelle 1.1 Auflistung der PKC-Isoformen und ihre Kofaktoren

Die PKC ist aus einer N-terminalen regulatorischen und einer C-terminalen katalytischen Domäne aufgebaut, die über eine bewegliche Scharnierregion (hinge Region) miteinander verbunden sind (Newton, 1995b). Diese Domänen sind aufgeteilt in konstante (C1 bis C4) und variable (V1 bis V5) Regionen (Coussens, 1986). Die regulatorische Domäne wird aus den Regionen C1 und C2 aufgebaut, die sich in den einzelnen Isoformen unterscheiden können. Die C1-Region bildet eine Cystein-reiche Struktur mit zwei Zinkfinger-Motiven aus und ist für die Diacylglycerol- und Phorbol-esterbindung verantwortlich (Cho, 2001). In den meisten Isoformen liegt die C1-Region als Tandemmotiv C1A und C1B vor (cPKC und nPKC), wobei sich beide Motive in ihrer Lipidaffinität voneinander unterscheiden können (Ananthanarayanan et al., 2003). Den aPKC's fehlt einer der beiden C1-Regionen, so dass nur ein Zinkfinger ausgebildet wird und DAG/Phorbol-ester nicht binden können. Die C2-Region ist für die Bindung von Phospholipiden und Ca^{2+} verantwortlich (Newton, 1997). Es wurde zunächst vermutet, dass nPKC's über keine C2-Region verfügen, da sie Ca^{2+} -unabhängig aktiviert werden. Sequenzanalysen konnten jedoch zeigen, dass sie eine der C1-Region vorgeschaltete C2-ähnliche Region aufweisen (Ochoa et al., 2001). Die regulatorische Domäne besitzt N-terminal die wichtige Pseudosubstratregion, die die Kennzeichen einer PKC-Phosphorylierungsstelle aufweist, nur mit dem Unterschied, dass sie ein Alanin an der entsprechenden Serin-/Threoninstelle besitzt (Arg¹⁹-Phe-Ala-Arg-Lys-Gly-Ala²⁵-Leu-Arg-Gln-Lys-Asn-Val³¹; House and Kemp, 1987). Diese Pseudosubstratregion interagiert mit der Substratbindungsstelle (C4-Region) und blockiert dadurch die Enzymaktivität (House and Kemp, 1987, Newton 1995b). Um den Einfluss der PKC zu untersuchen, können Peptide dieser Pseudosubstratregion (PKC₁₉₋₃₁) als Inhibitoren der PKC eingesetzt werden, die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls verwendet wurden. Die katalytische Domäne wird durch die Regionen C3 und C4 gebildet, die bei allen Isoformen homolog sind. Die C3-Region ist für die ATP-Bindung und die C4-Region für die Substratbindung verantwortlich. Abbildung 1.3 zeigt schematisch die Primärstruktur der verschiedenen PKC-Isoformen.

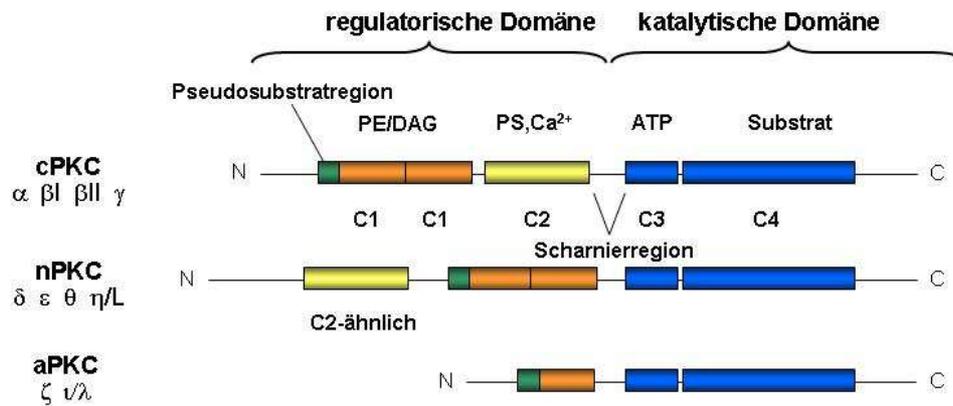


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Primärstruktur der PKC-Isoformen

Die PKC ist aus einer regulatorischen und einer katalytischen Domäne aufgebaut. Die regulatorische Domäne setzt sich aus verschiedenen konservierten Bereichen zusammen: der Pseudosubstratregion, der C1-Region sowie der C2-Region. Die C1-Region enthält ein Cystein-Motiv und bindet Diacylglycerol (DAG) oder Phorbol ester (PE). Die C2-Region der cPKC bindet Ca²⁺ und Phospholipide (PS), während die nPKCs mit einer C2-ähnlichen-Region kein Ca²⁺ binden. Die katalytische Domäne umfasst die C3-Region mit der ATP-Bindungsstelle sowie die C4-Region mit der Substratbindungsstelle. cPKC: konventionelle PKC; nPKC: neue PKC, aPKC: atypische PKC (modifiziert nach Newton, 1995b)

Die PKC liegt im inaktiven Zustand in einer gefalteten Form so vor, dass die Pseudosubstratregion der regulatorischen Domäne in Verbindung zur Substratbindungsstelle der katalytischen Domäne steht und somit der Zugang eines Substrates verhindert ist. Die Aktivierung der PKC ist mit einer Konformationsänderung und einer Translokation an die Zellmembran verbunden (Nishizuka, 1986), deren einzelne Schritte unter den Isoformen variieren können.

Die cPKC's werden durch Ca²⁺, DAG und Phosphatidylserin aktiviert. Zunächst bindet das Ca²⁺ an die C2-Region und induziert somit eine Konformationsänderung der PKC, die die Affinität gegenüber Phosphatidylserin erhöht und folglich zur Membrantranslokation führt (Newton, 2001). Die zusätzliche Bindung des membrangebundenen DAG's an die C1-Region führt zu einer weiteren Konformationsänderung, wodurch das Pseudosubstrat von der Substratbindungsstelle verdrängt wird und eine maximale Aktivität der PKC gewährleistet ist (Oancea and Meyer, 1998). Die

Aktivierung der nPKC's verläuft in gleicher Form nur mit dem Unterschied, dass kein Ca^{2+} gebunden wird (Hug and Sarre, 1993, Ron and Kazanietz, 1999). Das Fehlen der für die Ca^{2+} -Bindung notwendigen Aspartatreste bedingt eine Konformation, die bereits eine hohe Affinität gegenüber Phospholipiden hat (Newton, 1995b). Über die Aktivierung der aPKC-Isoformen ist noch nicht viel bekannt. Sie sind unabhängig von Ca^{2+} und DAG und werden stattdessen durch Phosphatidylserin aktiviert (Nishizuka, 1995).

Die für die PKC notwendigen Kofaktoren Ca^{2+} und DAG entstehen durch die Aktivierung der Phospholipase C β (PLC β) und Phospholipase C γ (PLC γ). Die Liganden-Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) stimuliert G-Proteine, die wiederum die PLC β aktivieren. G-Proteine sind heterotrimere Proteine, die bei Aktivierung in die GTP-bindenden α - und in die $\beta\gamma$ -Untereinheiten dissoziieren (Übersicht bei Neer, 1995). Sie werden in vier Hauptgruppen unterteilt; G $_s$ -, G $_i$ -, G $_q$ - und G $_{12/13}$ -Proteine (Neer, 1995), die sich in ihren stimulatorischen und inhibitorischen Wirkungen auf intrazelluläre Effektorsysteme wie die Adenylylcyclase (AC), die Guanylylcyclase (GC), die Phosphodiesterase (PDE) oder die Phospholipase C (PLC) voneinander unterscheiden. Die α -Untereinheiten der G $_q$ -Proteine aber auch G $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktivieren die PLC β (Smrcka and Sternweis, 1993, Neer et al., 1994, Neer et al., 1995, Zhou et al., 2008). Die PLC β hydrolysiert in der weiteren Folge das membranständige Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP $_3$) und DAG. IP $_3$ vermittelt die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Dieses Ca^{2+} bindet an die C2-Region der PKC und ruft eine Konformationsänderung hervor und erhöht somit die Affinität zu Phospholipiden. Das membranständige DAG bindet an die C1-Region und hält die PKC an der Membran. Die Translokation an die Membran induziert die Freisetzung der Pseudosubstratregion von der katalytischen Domäne und führt zur maximalen Aktivität der PKC. In Abbildung 1.4 ist die Aktivierung konventioneller PKCs modellhaft dargestellt.

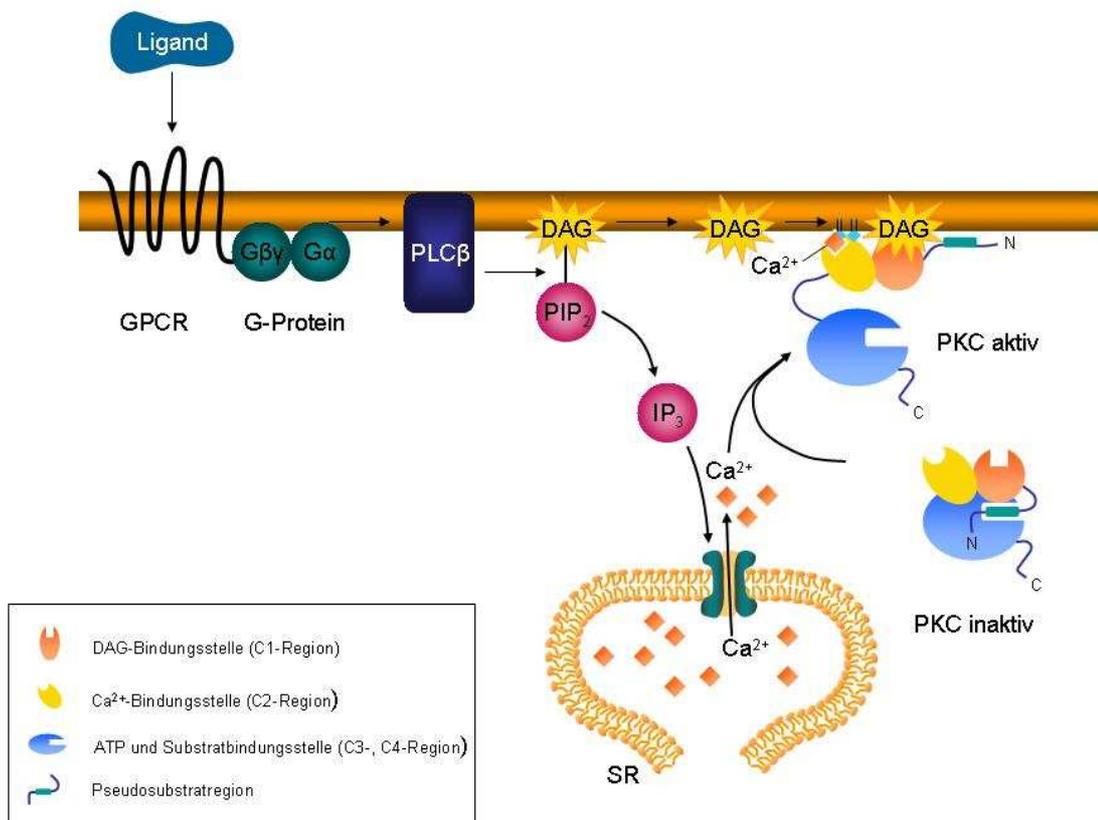


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Kofaktor-abhängigen Aktivierung konventioneller PKC

Die Bindung eines Liganden an den G-Protein-gekoppelten-Rezeptor (GPCR) führt zur Aktivierung des G-Proteins welches wiederum die Phospholipase C β (PLC β) stimuliert. PLC β spaltet PIP₂ in DAG und IP₃. Durch IP₃ wird intrazelluläres Ca²⁺ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) freigesetzt. Das Ca²⁺ fördert die Translokation der PKC zur Zellmembran, wo die eigentliche Aktivierung durch DAG erfolgt (modifiziert nach Newton, 2003).

Im aktiven Zustand kann die PKC jedoch sehr leicht durch Proteasen wie z.B. Calpain gespalten werden (Newton, 2001). Die Spaltung erfolgt direkt an der Scharnierregion aller PKCs (c-, n- und aPKC's), wodurch eine konstitutiv aktive katalytische Domäne entsteht (Kishimoto et al., 1983). Dieses konstitutiv aktive Fragment kann z.B. in *Patch-Clamp*-Untersuchungen verwendet werden.

1.4 Wissenschaftliche Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik die Regulation des BK-Kanals durch die PKC und die für die PKC-Regulation verantwortlichen molekularen Mechanismen zu untersuchen. Außerdem sollte das Zusammenspiel verschiedener Proteinkinasen auf die Aktivität des BK-Kanals ermittelt werden. Hier interessierte insbesondere die Interaktion der PKC mit der PKA und der PKG. Wegen der Möglichkeit selektiv Phosphorylierungsstellen für die PKC zu mutieren, sollten zunächst Versuche an klonierten BK-Kanälen durchgeführt werden, die zur funktionellen Überprüfung transient in HEK293-Zellen transfiziert wurden. Anschließend sollte die Regulation des BK-Kanals im nativen System untersucht werden. Dazu wurden frisch isolierte glatte Muskelzellen der Atemwege verwendet, da bereits in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass BK-Kanäle über die Stimulation des M₂-Muskarinrezeptors, die zur Aktivierung der PKC führt, gehemmt werden (Zhou et al., 2008). Des Weiteren sollte die Stöchiometrie der PKC-Phosphorylierung am tetrameren Kanalprotein untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Substanzen, Enzyme, Vektoren und Zelllinien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Laborchemikalien im höchsten Reinheitsgrad verwendet.

Bezeichnung	Hersteller
1,4-dithio-DL-threitol	Sigma, USA
4- α -PMA (4 α -Phorbol-12-myristate-13-acetate)	Biomol, Hamburg
Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz (ATP)	Roche, Mannheim
Agarose	Serva, Heidelberg
Alkalische Phosphatase:	
CIP (calf intestinal phosphatase)	New England Biolabs, Schwallbach
Aqua ad Injectabilia	Baxter, Unterschleißheim
Bakterienstämme:	
<i>Escherichia coli</i> Library Efficiency DH5 α	Invitrogen, Karlsruhe
BigDye-Kit	Perkin Elmer
BSA	Biochrom AG, Berlin
Carbachol (CCh)	Sigma, Taufkirchen
Collagenase	Sigma, USA
EDTA	Gibco, Karlsruhe
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Mannheim
Fetales Rinder Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Glucose	Merck, Mannheim
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Roth, Karlsruhe

Größenstandards:

Bench Top 1 kb Ladder	Promega, USA
2 Log Ladder	New England Biolabs, Schwallbach
Guanosin-5'-triphosphat, Kaliumsalz (GTP)	Sigma, Taufkirchen
HCl-Lösung 1 N	Merck, Mannheim
Hefe-Extrakt	Beckton Dickinson, Heidelberg
HEPES	Sigma, Taufkirchen
Hyaluronidase	Sigma, USA
Iberiotoxin (IbTX)	Latoxan , Frankreich
Isoprenalin	Sigma, USA
Isopropanol	Merck, Mannheim
Kaliumchlorid	Merck, Mannheim
Kaliumchlorid	Merck, Mannheim
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Mannheim
KOH-Lösung 1 N	Merck, Mannheim
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Magnesiumchlorid	Merck, Mannheim
Methanol	Merck, Mannheim
N ₂ , flüssig	Linde, Wiesbaden
NaOH-Lösung 1 N	Merck, Mannheim
Natriumbicarbonat	Biochrom AG, Berlin
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Mannheim
Okadainsäure	RBI, USA
Papain	Sigma, USA
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
PKA (katalytische Untereinheit der Proteinkinase A)	Biomol, Hamburg
PKA-Aktivator Sp-5,6-DCI-cBIMPS	BioLog, Bremen
PKC (konstitutiv aktive katalytische Untereinheit der Proteinkinase C)	Biomol, Hamburg

PKC ₁₉₋₃₁	Biomol, Hamburg
PKC-Inhibitor Gö 6976	Calbiochem, Darmstadt
PKC-Aktivator PMA (Phorbol 12-myristate 13 acetate)	Biomol, Hamburg
PKC-Inhibitor Ro 31-8220	Biomol, Hamburg
PKG (PKG I α)	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ruth; Pharmakologie und Toxikologie, Pharmazeutisches Institut der Universität Tübingen
PKG-Aktivator 8-pCPT-cGMP	BioLog, Bremen
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Polymerasen:	
<i>Taq</i> -DNA-Poylmerase	USB Corporation, USA
PfuUltra-Poymerase	Stratagene, USA
Phusion-Polymerase	Finnzymes, Finnland
PPI2	Biomol, Hamburg
Protein-A-Sepharose	GE Healthcare, München
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme:	
Afl I, BstE II, EcoR I, Hind III, Kpn I, Pst I, Sac II, Xba I, Xho I,	New England Biolabs, Schwalbach
Trypsin/EDTA	Biochrom AG, Berlin
T4-DNA-Ligase	USB Corporation, USA
Zelllinien: HEK 293-Zellen	Stratagene, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Einwegküvetten	Sarstedt, Heidelberg
Einwegspritzen	Braun, Melsungen
Einwegpipetten (1, 2, 5, 10, 25 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier	Whatman, UK
Falcon Röhrchen (15, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Gewebekulturflaschen 50 ml und 250 ml	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturschalen (35/10 mm)	Greiner, Frickenhausen
Glaskapillaren TW 150F-4	WPI, USA
Indikatorband zum Autoklavieren	3M, USA
Latex-Handschuhe	SafeSkin GmbH, Neufahrn
Parafilm	American National Can, USA
Pasteurpipetten	Brand GmbH, Wertheim
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Rührstäbchen	Sarstedt, Heidelberg
Spritzenfilter	Costar, Baar
Sterilfilter (0,22 µm)	Millipore GmbH, Schwallbach
Zellstofftücher	Wepa, Arnsberg

2.1.3 Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	Mettler, Schweiz
Autoklav	Tuttnauer, Wesel
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Digitalwaage	Sartorius, Göttingen
Elektrophoresekammern:	Biometra, Göttingen Pharmacia Biotech
Heizblock	SEL, England

Kühltruhen (-20 °C, -80 °C)	Kryotec, Hamburg
Laminar-Flow Werkbank HERA Safe	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	Janke and Kunkel, Staufen i. Br.
Mikromanipulator WR-6	Narishige, Japan
Mikroskop Axiovert 10	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop ID 03	Zeiss, Oberkochen
<i>Patch-Clamp</i> Software ISO-3	MFK, Niedernhausen
<i>Patch-Clamp</i> -Verstärker L/M EPC-7	HEKA, Lambrecht
PCR-Gerät:	
Thermocycler GeneAmp 2400	Perkin Elmer
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenpuller DMZ-Universal	Zeitz-Instrumente, Augsburg
Spektrophotometer	Perkin Elmer, Palo Alto, USA
Thermoschüttler	Schuttron, UK
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Trockenschrank	Heraeus, Hanau
UV-Auflichtdetektor MiniBis Pro	DNr Bio-Imaging Systems, USA
Vektoren:	
pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe
pUC19	Invitrogen, Karlsruhe
Vortexer	Janke and Kunkel, Staufen i. Br.
Wärmebad	Julabo, Seelbach
Zentrifuge (J2-MC)	Beckmann, USA

2.1.4 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
<u>Agarosegel 0.7 %</u>	0.21 g 30 ml 0.6 µl	Agarose TAE-Puffer Ethidiumbromid
<u>BBS-Puffer</u>	25 mM 140 mM 0.75 mM	BES NaCl Na ₂ HPO ₄
<u>Calcium-Phosphat-Puffer 2.5 M</u>	3.68 g in 10 ml	CaCl ₂ x 2H ₂ O Aqua ad Injectabilia
<u>LB-Nährmedium</u> pH 7.4 autoklaviert	10 g 5g 10g 100 mg in 1 l	Pepton Hefeextrakt NaCl Ampicillin Aqua ad Injectabilia
<u>PBS-Puffer</u>	137 mM 2.7 mM 10 mM 1.8 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
<u>TAE-Puffer</u> pH 8.0	0.04 M 0.001 M	Tris-acetate EDTA
<u>Zellkulturmedium</u>	50 ml 50 ml 15 ml 5 ml 5 ml In 500 ml	10x MEM-Earle- Medium FCS 7.5 % NaHCO ₃ L-Glutamin Pen/Strep 10000 U Aqua ad Injectabilia

2.1.5 Primer Sequenzen

Primer	Sequenz
<u>Overlap-PCR</u>	
Mutationsprimer (MutP)	
393F	5' CGGTT GCT GGAAGAAAGCACATAGTGGTCTGT 3'
393R	5' GTGCTTTCTTCCAG GCA ACCGCACTATAGGAG 3'
625F	5' ACAAG GCCG CCAATCGAGAGAGCCG 3'
625R	5' GCGG CCTT GTACTCAATGGCTATCATGAGAAG 3'
630F	5' AGAG GCCCG TATATTAATTAATCCTGGAAACC 3'
630R	5' ATACGG GCCT CTCGATTGGCGGACTTGT 3'
695F	5' GAAGATGAACAGCCGTCGACACTG GC ACCCA 3'
695R	5' TTGGGTG CC AGTGTGACGGCTGTTTCATCTTCA 3'
712F	5' AGCTCG GCG CCCAAGCTGATGAGGCATGAC 3'
712R	5' GCG CCG AGCTGGGTGAGTTCCGCATGCCTC 3'
1129F	5' GCTCC GCT AGCAAGAAGAGCTCCTCCGTCCA 3'
1129R	5' GAGCTCTTCTTGCTAG CGG ACTGGGACGAGT 3'
M1	5' AAG GCCC GGGAGTCCCGAGACAAACAGAAGTAC 3'
M2	5' GGACTCCCGGG CCTT GGGCGGTTCTGTCCG 3'
M3	5' AAGTCCCGGGAG GCCC GAGACAAACAGAAGTAC 3'
M4	5' GG CCT CCCGGGACTTGGGCGGTTCTGTCCG 3'
M5	5' AAG GCCC GGGAG GCCC GAGACAAACAGAAGTAC 3'
M6	5' GG CCT CCCGGG CCTT GGGCGGTTCTGTCCG 3'

Primer (P)

BK2F	5' CATTGAGTACAAGTCCGCCA 3'
BK2R	5' CAGCGCTAACTGGGCCACACG 3'
BK3F	5' GGCTCTTACCTACTGGGAAT 3'
BK3Ra	5' CAAGCCGTTTGCAGCCGCAT 3'
F8	5' GCAGCCGTTTGCATGTGGGA 3'
SpR	5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'
Sp6	5' ATTTAGGTGACACTATAGAACTC 3'

Quikchange

Mutationsprimer

Mut Y347VF	5' CGGGGATGTT GTT GCAAAAACCACGCT C 3'
Mut Y347VR	5' GAGCGTGGTTTTT GCAACA ACATCCCCG 3'
Mut 499F	5' AGAGTCATC GCC ATAAAGAACTACCACCCG 3'
Mut 499R	5' CTTTATGG CG ATGACTCTCATGATGTTGGAGG 3'
Mut S695D F	5' GCCGTGACACTG GAT CCCCAAAAAAGCAGC 3'
Mut S695D R	5' GCTGCTTTTTTTTGGG ATCC AGTGTCGACGGC 3'
Mut S1151DF	5' GAACCGGCCCAAG GAC CGGGAGTCCCGAGA 3'
Mut S1151DR	5' TCTCGGGACTCCCGG TC CTTGGGCGCGTTC 3'

2.1.6 Programme

Homologievergleiche von Sequenzdaten wurden in den Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt. Tabellenkalkulationen und Abbildungen wurden mit Hilfe des MS-Office Pakets von Microsoft und dem SigmaPlot Programm Version 11.0 für Windows (SPSS Inc., USA) erstellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

2.2.1.1 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Unter dem Begriff Restriktion wird die hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen verstanden. Die analytische (20 µl Endvolumen) und präparative (50-100 µl Endvolumen) Restriktion von DNA erfolgte nach den detaillierten Vorschriften des Herstellers (New England Biolabs). Die Spaltung mit zwei Enzymen wurde gleichzeitig durchgeführt, da die Bedingungen kompatibel waren. Linearisierte Vektoren mit nur einer Schnittstelle wurden einer Dephosphorylierung unterzogen, um Phosphatreste am 5'-Ende zu entfernen, wodurch eine Selbstligation des Plasmids verhindert wurde. Dephosphoryliert wurde mit einer alkalischen Phosphatase (Calf intestinal phosphatase, CIP) der Firma New England Biolabs nach den Anweisungen des Herstellers.

2.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA-Molekülen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle ist von verschiedenen Faktoren wie dem Molekulargewicht, der Konformation der DNA und von der Agarosekonzentration im Gel abhängig. Mit Hilfe des interkalierenden Agens Ethidiumbromid kann die Position der DNA-Fragmente im Agarosegel unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Molekülen wurden Agarosegele verwendet, die 0,7 % Agarose enthielten. Dazu wurde die Agarose mit TAE-Puffer (Zusammensetzung siehe 2.1.4) erhitzt und anschließend mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0.5 µg/µl) versetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit 1/6 ihres Volumens mit Probenpuffer (30 % (v/v) Glycerol, 0.25 % (w/v) Bromphenolblau, in TE-Puffer) vermischt, als Größenstandard wurde die Bench Top 1 kb Ladder der Firma Promega verwendet. Die Auftrennung erfolgte in einer Elektrophoresekammer bei einer konstanten Spannung von 5-8 V/cm mit

TAE-Puffer als Laufpuffer. Die Dokumentation der DNA-Auftrennung im Agarosegel wurde mit dem MiniBis Pro (DNA Bio-Imaging Systems) durchgeführt.

2.2.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNA im Agarosegel wurde das entsprechende Gelstück, welches die zu isolierende DNA enthielt, mit einem sterilen Skalpell unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*) verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten gemäß den detaillierten Anweisungen des Herstellers.

2.2.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligationen wurde die T4-DNA-Ligase (USB Corporation) verwendet, die die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen zwei DNA-Fragmenten katalysiert. Für die Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Vektor wurden 20-40 ng linearisierte Vektor-DNA mit Insert-DNA in 3-fachem molarem Überschuss in 20 µl Endvolumen in 1 x Ligasepuffer mit 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) über Nacht bei 16°C inkubiert. Zur Transformation von 50 µl Library Efficiency DH5α kompetente *E.coli*-Zellen wurde 1 µl des Reaktionsansatzes eingesetzt.

2.2.1.5 Transformation von Bakterien

Unter einer Transformation wird die Veränderung des zellulären Genotyps durch die Übertragung von DNA in eine Zelle verstanden.

50 µl Library Efficiency DH5α kompetente *E.coli*-Zellen (Invitrogen) wurden mit 1 µl Ligationsansatz gemischt und für 30 Minuten auf Eis, 30 Sekunden bei 42°C und abschließend erneut 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium wurden die Zellen unter Schütteln (225 rpm) für 1 h bei 37°C kultiviert. Anschließend erfolgte die Ausplattierung von 100 µl Zellsuspension auf Platten mit dem entsprechenden Selektionsmedium (Ampicillin 100 µg/ml). Die restliche Zellsuspension wurde bei 4000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und bis auf 100 µl der gesamte Überstand verworfen. Die in 100 µl resuspendierten *E.coli*-Zellen wurden anschließend

ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aufgrund des Antibiotikums in den Agarplatten erfolgte eine Selektion, bei der nur die Zellen wuchsen, die ein Plasmid aufgenommen hatten, welches das entsprechende Resistenzgen trug.

2.2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Nach der Transformation wurden von den Transformationsplatten einzelne Bakterienkolonien in je 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin in Flüssigkultur gebracht und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 225 rpm inkubiert. Aus der Flüssigkultur wurde dann die Plasmid-DNA durch Minipräparation nach Angaben des Herstellers mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von *Qiagen* isoliert und in 50 µl H₂O aufgenommen. Je 0.5 µl der isolierten Plasmid-DNA wurden mit spezifischen Restriktionsendonukleasen verdaut (siehe Abschnitt 2.2.1.1), um zu bestimmen, ob die Plasmide die zu klonierende DNA-Fragmente aufgenommen haben. Die Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert (siehe Abschnitt 2.2.1.2). Die Plasmid-DNA positiver Klone wurde aus einer 100 ml Kultur mittels Maxi-Präparation mit dem Plasmid Maxi Kit von *Qiagen* isoliert und in 400 µl H₂O gelöst. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Photometer bestimmt. Die DNA wurde anschließend entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert

2.2.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt. Dabei entsprechen:

1 OD₂₆₀ = 50 µg/ml für doppelsträngige DNA

2.2.2 Zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der zielgerichteten Mutagenese („site-directed mutagenesis“) mit Hilfe der PCR ermöglicht die gezielte Veränderung bestimmter DNA-Sequenzen innerhalb eines Gens. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, um die Regulation des BK-Kanals durch die PKC näher zu untersuchen. Die PKC überträgt Phosphatreste auf Serin- oder Threoninreste auf ihre Zielproteine. Die manuelle Suche von putativen PKC-Phosphorylierungsstellen mit den Konsensussequenzen $(R/K_{1-3}, X_{0-2})-S^*/T^*-(X_{0-2}, R/K_{1-3})$; $S^*/T^*-(X_{0-2}, R/K_{1-3})$ und $(R/K_{1-3}, X_{0-2})-S^*/T^*$ (Kennelly and Krebs, 1991; R=Arginin; K=Lysin; S=Serin; T=Threonin; X=beliebige Aminosäure; *=Phosphorylierungsstelle) in der Isoform A des BK-Kanals ergab neun Serinstellen im C-Terminus (Ser³⁹³, Ser⁴⁹⁹, Ser⁶²⁵, Ser⁶³⁰, Ser⁶⁹⁵, Ser⁷¹², Ser¹¹²⁹, Ser¹¹⁵¹, Ser¹¹⁵⁴). Davon liegen zwei als PKC Tandemmotiv vor (Ser⁶²⁵/Ser⁶³⁰ und Ser¹¹⁵¹/Ser¹¹⁵⁴). Diese identifizierten Serinstellen wurden für die entsprechenden Versuche mittels zielgerichteter Mutagenese durch Alanin oder Aspartat ersetzt. Die Substitution durch Alanin führte aufgrund ihrer chemischen Struktur dazu, dass der BK-Kanal an dieser Position nicht mehr durch die PKC phosphoryliert werden konnte. Durch Einführung von Aspartat konnte die negative Ladung einer Phosphorylierung an dieser Position imitiert werden. In einem weiteren Versuch wurde untersucht, wieviele der vier α -Untereinheiten des BK-Kanals durch die PKC phosphoryliert sein müssen, um die Kanalaktivität zu hemmen. Zu diesem Zweck wurde in der Porenregion eine bereits bekannte Tyrosinstelle Tyr³⁴⁷ des BK-Kanals verwendet, welches für die TEA-Sensitivität verantwortlich ist (Tian et al., 2004, die in der Literatur beschriebene Y³³⁴V Porenmutante entspricht der Y³⁴⁷V Mutante im BK_A-Klon der vorliegenden Arbeit). Dazu wurde das Tyr³⁴⁷ gegen Valin ersetzt, so dass die TEA-Sensitivität aufgehoben wurde. Durch Mischung der cDNAs von α -Untereinheiten des nicht-mutierten BK-Kanals (BK_A) und der Porenmutante (T³⁴⁷V) entstehen Kanäle mit unterschiedlicher Zusammensetzung der vier Untereinheiten, deren Sensitivität gegenüber TEA mit Zunahme der Porenmutanteneinheiten abnimmt. Ein Kanal bestehend aus vier

BK_A-untereinheiten wird dabei komplett durch TEA gehemmt, während die Sensitivität im Falle von vier Porenmutantenuntereinheiten aufgehoben ist. Zur Erzeugung zielgerichteter Mutationen wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet. Die Mutationen S³⁹³A, S⁶²⁵A, S⁶³⁰A, S⁶²⁵A/S⁶³⁰A, S⁶⁹⁵A, S⁷¹²A, S¹¹²⁹A, S¹¹⁵¹A, S¹¹⁵⁴A und S¹¹⁵¹A/S¹¹⁵⁴A wurden mit Hilfe der Overlap-PCR eingeführt. Für die Mutationen S⁴⁹⁹A, S⁶⁹⁵D, S¹¹⁵¹D, S⁶⁹⁵D/S¹¹⁵¹D, S⁶⁹⁵D/S¹¹⁵¹A und Y³⁴⁷V wurde eine zweite Methode angewendet, die sich von der QuikChange Site-Directed Mutagenesis Methode ableitet.

2.2.2.1 Overlap-PCR

Die oben erwähnten Mutanten wurden mit Hilfe der Overlap-PCR hergestellt. Im Vergleich zur Standard-PCR werden bei der Overlap-PCR Primer verwendet, die die einzuführende Mutation beinhalten (siehe Abschnitt 2.1.5). Die Mutations-Primer binden trotz Mismatch über 1 bis 2 Basen an die Template-DNA und führen damit zur Amplifizierung von PCR-Fragmenten, die die Mutation tragen (siehe Abbildung 2.2). Die Overlap-PCR bestand aus zwei PCR-Teilschritten. Im ersten Schritt wurden zwei unabhängige PCR-Reaktionen mit jeweils einem Mutations-Primer (MutP) und einem außerhalb der Mutations-Region liegenden Primer (P) durchgeführt (siehe Tabelle 2.1). In Abbildung 2.2 sind die einzelnen Schritte der Overlap-PCR dargestellt.

Die genaue Sequenz der entsprechenden Primer ist in Abschnitt 2.1.5 aufgeführt. Dabei wurden die Mutations-Primer so gewählt, dass sich die PCR-Produkte im Bereich der Mutation überlappen. Für die PCR wurde die PfuUltra-Polymerase von Stratagene eingesetzt, zusammen mit 50 ng der Template-DNA, 20 nmol je dNTP, 20 pmol je Primer und 2.5 Unit PfuUltra-Polymerase in 1 x Reaktionspuffer (50 µl Ansatz). Nach 35 Amplifikationszyklen wurden die PCR-Fragmente über ein präparatives Agarosegel (siehe Abschnitt 2.2.1.2) aufgetrennt und anschließend die Fragmente der erwarteten Größe isoliert. Zur Isolierung der DNA wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*) nach den Anweisungen des Herstellers verwendet (siehe Abschnitt 2.2.1.3).

In einem zweiten PCR-Schritt wurden die isolierten PCR-Produkte zusammengefügt. Dabei dienten die überlappenden 3'-Enden jeden Strangs als Primer für die Synthese des Gegenstrangs. Das resultierende Produkt enthält weiterhin die Mutation, überspannt jetzt jedoch die gesamte Sequenz zwischen beiden außerhalb der Mutation gelegenen Primern. Dieses Fragment wurde anschließend durch Zugabe der außerhalb der Mutation liegenden Primer weiter amplifiziert. Die Synthese der DNA-Fragmente erfolgte mithilfe der *Taq*-DNA-Polymerase (USB Corporation). Das Volumen der Reaktionsansätze betrug 50 μ l mit je 20 nmol dNTP, 1 Unit *Taq*-DNA-Polymerase und je 20 pmol Primer in 1 x Reaktionspuffer. Die amplifizierte DNA wurde über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt und wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (siehe Abschnitt 2.2.1.1) verdaut. Nachdem das nicht-mutierte Fragment mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen aus der Isoform A (BK_A) entfernt wurde, konnte das mutierte Fragment hineinkloniert werden. Der Restriktionsverdau (BstE II/Afl II) der Mutanten S³⁹³A, S⁶²⁵A, S⁶³⁰A und S⁶²⁵A/S⁶³⁰A führte zu einem Verlust eines BstE II-Fragmentes, da in dem Plasmid zwei Schnittstellen für BstE II vorhanden waren. Dieses Fragment wurde nachträglich über eine Ligation eingefügt. Zum besseren Verständnis zeigt Abbildung 2.1 die zu mutierenden Serinstellen mit den entsprechenden Primern und Restriktionsschnittstellen. Die Zusammensetzung der Primer und der Restriktionsendonukleasen ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

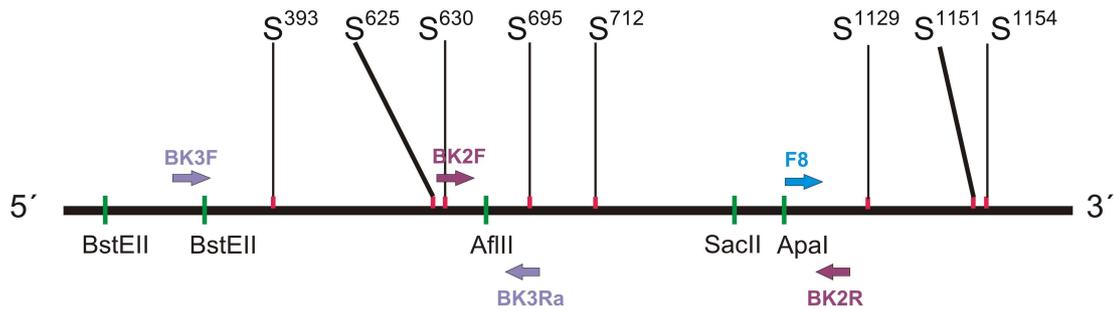


Abbildung 2.1 Restriktionsschnittstellen und Primer innerhalb der BK_A-Kanal kodierenden cDNA

Dargestellt ist die gesamte Länge der für den BK_A-Kanal kodierenden cDNA. Rote Markierungen zeigen die Stelle der gewünschten Mutation. Die entsprechenden Mutationsprimer (MutP) sind nicht dargestellt, da sie sich direkt an der zu mutierenden Stelle befinden. Die außerhalb der Mutation liegenden Primer sind farblich mit einem Pfeil dargestellt. Grüne Markierungen stellen die verwendeten Restriktionsschnittstellen dar. Die Restriktionsschnittstelle SpR bzw. SP6 und die zweite Restriktionsschnittstelle der Apa I ist hier nicht dargestellt, da es sich in der pcDNA3 befindet.

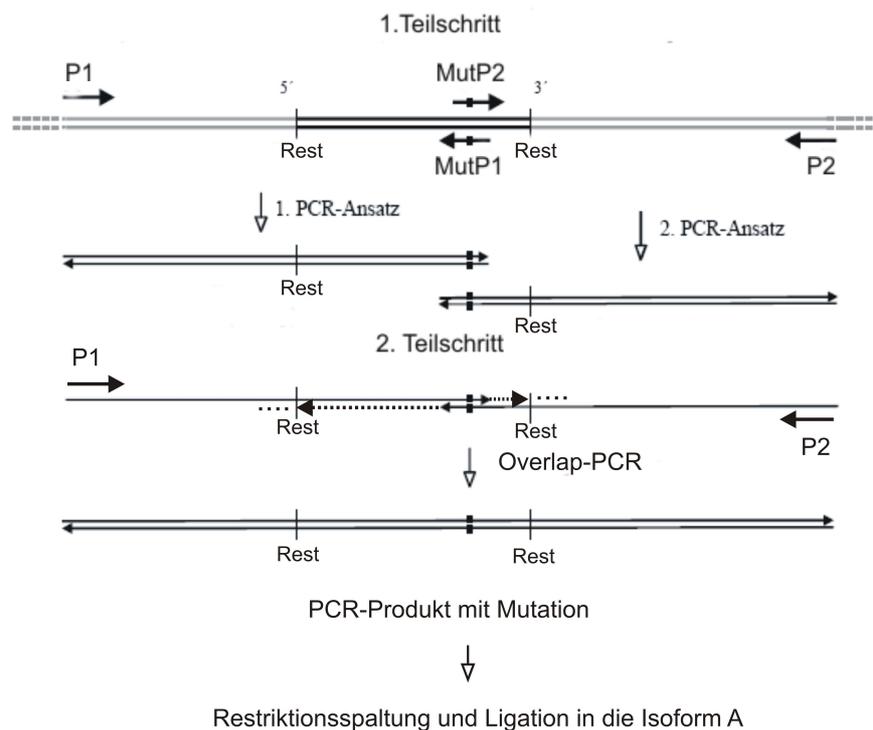


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der Overlap-PCR

Unter Standard-PCR-Bedingungen wurden zuerst zwei Fragmente des Gens, jeweils mit einem Mutations-Primer (MutP1 oder MutP2) und einem außerhalb der Mutation liegenden Primer (P1 oder P2) amplifiziert, auf einem Agarosegel getrennt und gereinigt. Beide Fragmente wurden dann zusammen einer zweiten PCR unterworfen, wobei die überlappenden Enden als Primer dienten und nur die äußeren Primer zugegeben wurden. Das mutierte Gen wurde anschließend über zwei Restriktionsschnittstellen (Rest) in die Isoform A kloniert.

Mutante	Primer: 1. PCR-Schritt	Annealing	Primer: 2. PCR-Schritt	Annealing	Elongation	Restriktion
S ³⁹³ A	BK3F/393R 393F/BK3Ra	55 °C	BK3F/BK3Ra	65 °C (1 min)	72 °C (1 min 30 s)	BstE II/ Afl II
S ⁶²⁵ A	BK3F/625R 625F/BK3Ra	60 °C	BK3F/BK3Ra	65 °C (1 min 30 s)	72 °C (1 min 30 s)	BstE II/ Afl II
S ⁶³⁰ A	BK3F/630R 630F/BK3Ra	60 °C	BK3F/BK3Ra	65 °C (1 min 30 s)	72 °C (1 min 30 s)	BstE II/ Afl II
S ⁶²⁵ A/S ⁶³⁰ A (Ausgangs- DNA ist die Mutante S ⁶²⁵ A)	BK3F/630R 630F/BK3Ra	60 °C	BK3F/BK3Ra	65 °C (1 min 30 s)	72 °C (1 min 30 s)	BstE II/ Afl II
S ⁶⁹⁵ A	BK2F/695R 695F/BK2R	60 °C	BK2F/BK2R	65 °C (1 min 30 s)	72 °C (1 min 30 s)	Afl II/ Sac II
S ⁷¹² A	BK2F/712R 712F/BK2R	60 °C	BK2F/BK2R	65 °C (1 min 30 s)	72 °C (1 min 30 s)	Afl II/ Sac II
S ¹¹²⁹ A	F8/1129R 1129F/SpR	56 °C	F8/SpR	48 °C (30 s)	72 °C (1 min 30 s)	Apa I
S ¹¹⁵¹ A	M1/SP6 F8/M2	55 °C	F8/Sp6	68 °C (3 min)	72 °C (2 min)	Apa I
S ¹¹⁵⁴ A	M3/Sp6 F8/M4	55 °C	F8/Sp6	68 °C (3 min)	72 °C (2 min)	Apa I
S ¹¹⁵¹ A/S ¹¹⁵⁴ A	M5/Sp6 F8/M6	55 °C	F8/Sp6	48 °C (3 min)	72 °C (2 min)	Apa I

Tabelle 2.1 Zusammensetzung der Primer und die entsprechenden Restriktionsenzyme

Folgende Temperaturen und Zeiten wurden für die PCR-Schritte verwendet:

1. PCR-Schritt

	Temperatur	Zeit	
Vordenaturierung	94 °C	3 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	} 35 Zyklen
Annealing	55-60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Abschließende Elongation	72 °C	3 min	

2. PCR-Schritt (Overlap-PCR)

	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	94 °C	30 s	} 11 Zyklen
Annealing	48-65 °C	1 min - 1 min 30 s	
Elongation	72 °C	1 min 30 s - 2 min	
Abschließende Elongation	72 °C	3 min	
	Hold 72 °C		

→ **Zugabe der Primer aus Tabelle 2.1**

Denaturierung	94 °C	30 s	} 35 Zyklen
Annealing	63 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min 30 s	
Abschließende Elongation	72 °C	3 min	

2.2.2.2 Abgeleitete Form der QuikChange Site-Directed Mutagenesis Methode

Die weiteren Punktmutationen wurden über eine zweite Methode eingeführt, die sich von der QuikChange Site-Directed Mutagenesis Methode ableitet. Mit Hilfe dieser Methode wurden Serine in Alanin bzw. Aspartat und Tyrosin in Valin umgewandelt und folgende Mutanten hergestellt: S⁴⁹⁹A, S⁶⁹⁵D, S¹¹⁵¹D, S⁶⁹⁵D/S¹¹⁵¹D, S⁶⁹⁵D/S¹¹⁵¹A und Y³⁴⁷V. Hierfür wurden 28-32 Nucleotid lange Mutagenese-Primerpaare konzipiert, die jeweils gegen den Sinn- und den Gegenstrang der für die Isoform A des BK-Kanals kodierenden cDNA gerichtet sind und sich über weite Bereiche überlappen. Innerhalb dieser Oligonucleotid-Primer wurden 1-3 Nucleotide so abgewandelt, dass das entsprechende Triplet für die neue, geänderte Aminosäure kodiert. Die Mutation wurde mit dem geringst möglichen Austausch an Nucleotiden durchgeführt, um der idealen Schmelztemperatur für die Primer von $T_m \geq 75$ °C möglichst nahe zu kommen.

Als Ausgangs-DNA wurde die für die Isoform A des BK-Kanals kodierende cDNA im pcDNA3-Vektor (pcDNA/BK) verwendet, während anschließend für die Mutante S⁶⁹⁵D/S¹¹⁵¹A die cDNA der Mutante S⁶⁹⁵D verwendet wurde. Für die Herstellung der Mutanten S⁴⁹⁹A, S⁶⁹⁵D, S¹¹⁵¹D, S⁶⁹⁵D/S¹¹⁵¹D und

S⁶⁹⁵D/S¹¹⁵¹A konnte das gesamte Konstrukt als Template verwendet werden, während für die Substitution des Tyrosin gegen Valin (Y³⁴⁷V) ein Hind III-Fragment (1850 bp) aus dem Vektor pcDNA/BK herausgeschnitten und in den Vektor pUC19 umkloniert wurde. Für die Mutations-PCR wurden die Phusion-Polymerase von Finnzymes eingesetzt, zusammen mit 50 ng der oben beschriebenen Templates, 20 nmol je dNTP, 15 pmol je Primer und 1 Unit Phusion-Polymerase in 1 x Reaktionspuffer (50 µl Ansatz). Die Mutations-PCR zur Herstellung der Mutanten S⁴⁹⁹A und Y³⁴⁷V wurde mit der PfuUltra-Polymerase der Firma Stratagene durchgeführt, zusammen mit 50 ng der Template-DNA, 20 nmol je dNTP, 20 pmol je Primer und 2.5 Unit PfuUltra-Polymerase in 1 x Reaktionspuffer (50 µl Ansatz). Die genaue Sequenz der entsprechenden Primer ist in Abschnitt 2.1.5 dargestellt. Die Annealing-Temperatur und die Zeit der Elongation wurden an Hand der Primer und der Länge des Templates individuell eingestellt. Durch die PCR-Reaktion wurde somit die gesamte Länge des Templates amplifiziert, wodurch am Ende ein Gemisch aus dem vorgelegten Template (ohne Mutation) und den PCR-Produkten (mit Mutation) vorlag. Die Inkubation der Ansätze erfolgte in einem DNA-Thermocycler GeneAmp 2400 PCR System der Firma Perkin Elmer, wobei die Programmierung der Zyklen folgendermaßen aussah:

	Temperatur	Zeit	
Vordenaturierung	95-98 °C	1 min	
Denaturierung	95-98 °C	15 s -1 min	} 30-35 Zyklen
Annealing	55-58 °C	30 s -1 min	
Elongation	72 °C	5 min -9 min	
Abschließende Elongation	72 °C	3 min	

Mutante	Vordenaturierung + Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
S ⁴⁹⁹ A	95°C (1 min) 95°C (1 min)	55°C (1 min)	72°C (9 min)	30
S ⁶⁹⁵ D	98°C (1 min) 98°C (15 s)	58°C (30 s)	72°C (6 min)	35
S ¹¹⁵¹ D	98°C (1 min) 98°C (30 s)	58°C (30 s)	72°C (6 min)	35
S ⁶⁹⁵ D/S ¹¹⁵¹ D (Ausgangs-DNA ist die Mutante S ¹¹⁵¹ D)	98°C (1 min) 98°C (15 s)	58°C (30 s)	72°C (6 min)	35
S ⁶⁹⁵ D/S ¹¹⁵¹ A (Ausgangs-DNA ist die Mutante S ⁶⁹⁵ D)	98°C (1 min) 98°C (15 s)	58°C (30 s)	72°C (6 min)	35
Y ³⁴⁷ V	95°C (1 min) 95°C (1 min)	55°C (1 min)	72°C (5 min)	30

Tabelle 2.2 Übersicht der PCR (Temperatur, Zeiten und Anzahl der Zyklen)

Der PCR-Reaktionsansatz wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym Dpn I (20 Units) für 1 h bei 37°C verdaut. Dieses Restriktionsenzym schneidet die entsprechenden Erkennungsstellen nur dann, wenn diese methyliert sind. Während das ursprüngliche Plasmid methyliert ist und folglich abgebaut wird, bleibt die neu synthetisierte, nicht-methylierte DNA, welche die gewünschte Mutation aufweist, erhalten. Die so isolierten PCR-Produkte, die zu diesem Zeitpunkt noch im offen-zirkulären Zustand vorlagen, wurden in Library Efficiency kompetente *E.coli*-DH5 α Zellen transformiert (siehe Abschnitt 2.2.1.5), wo durch endogene bakterielle Enzyme die Strangbrüche repariert wurden. Die Plasmide wurden in Bakterien vermehrt und anschließend aus den Zellen isoliert. Aus der im pUC19 Plasmid hergestellten Mutante Y³⁴⁷V wurde das entsprechende Hind III DNA-Fragment durch Restriktionsendonukleasen wieder herausgeschnitten und in den Vektor pcDNA3/BK kloniert, welches zuvor ebenfalls mit Hind III geschnitten wurde. Die fertigen Plasmide mit den entsprechenden Mutationen aus beiden Mutationsmethoden wurden zum Abschluss über die gesamte Länge sequenziert, um weitere zufällige Mutationen, die durch die Polymerase

eingeführt sein könnten, auszuschließen. Die Sequenzierung erfolgte mit der Cycle Sequencing-Methode unter Verwendung des BigDye-Kits im eigenen Labor, die Auftrennung und Darstellung der Sequenzierungsprodukte wurde im Servicelabor des Klinikums durchgeführt, indem die Nukleotidabfolge der DNA durch Anregung der fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide bestimmt wurde.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von Zelllinien und Aussaat von Zellen

Die Subkultivierung der HEK293-Zellen erfolgte bis zur Konfluenz des Zellrasens in Zellkulturflaschen (250 ml) im 4 Tage Rhythmus. Zellkulturmedien und Puffer-Lösungen wurden auf 37°C erwärmt. Zunächst wurden die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen, anschließend mit 0.1 % Trypsin von der Unterlage abgelöst und durch Schwenken und auf- und abpipettieren voneinander getrennt. Die Trypsinbehandlung wurde durch Zugabe von frischem Zellkulturmedium gestoppt und zur weiteren Kultivierung verdünnt in eine neue Gewebekulturflasche (250 ml) überführt. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde eine Neubauerkammer verwendet, die eine Abschätzung der Zellzahl pro Milliliter ermöglicht. Die Lagerung erfolgte bei 37°C und 6 % CO₂. In allen Experimenten wurden Zellkulturpassagen zwischen 5 und 25 für die elektropysiologische Untersuchungen verwendet. Für elektrophysiologische Untersuchungen wurden je 200.000 Zellen pro 35 mm-Gewebekulturschale in 2 ml Zellkulturmedium überführt und um eine Haftung auf der Unterlage zu ermöglichen für 24 h bei 37°C und 6 % Co₂ inkubiert.

2.2.3.2 Transiente Transfektion von Zellen

Unter einer Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA in lebende eukaryotische Zellen bezeichnet. Als Transfektionssystem wurde die humane Zelllinie HEK293 benutzt. Diese Zellen wurden mit der α -Untereinheit des BK-Kanals aus der Rindertrachea transient transfiziert (GenBank™ Zugangsnummern: AY033472 (BK_A); AY033474 (BK_C)). Im

Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Ca^{2+} -Phosphat Transfektion angewendet, eine der ältesten und weitverbreitetsten Methoden zum Gentransfer (Graham et al., 1973).

Für eine Transfektion wurden pro 35 mm-Gewebekulturschale 4 μg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Plasmid-DNA wurde in 250 mM CaCl_2 -Lösung aufgenommen. Zur Identifizierung transfizierter Zellen, wurde die jeweilige Plasmid-DNA mit der für das grün fluoreszierende Protein eGFP kodierenden DNA kotransfiziert. Anschließend wurde das DNA/ CaCl_2 -Gemisch unter ständigem Schütteln tropfenweise zu derselben Menge PBS-Puffer pipettiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach kurzem Schütteln wurde das Präzipitat tropfenweise auf die zu transfizierenden HEK293-Zellen gegeben. Die so behandelten Zellen wurden 16-18 h bei 35°C und 3 % CO_2 -Gehalt inkubiert und anschließend nach einmaligem Waschen mit PBS (37°C) weitere 24-48 h in Zellkulturmedium kultiviert (6 % CO_2 , 37°C). Die Transfektionsrate lag zwischen 50-70 %.

2.2.3.3 Tiere, Gewinnung von Trachealzellen, Einzelzellisolierung

Alle Versuche wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Es wurden C57BL/6 Mäuse verwendet, die aus der Tierzucht des Klinikums bezogen wurden. Alle Tiere wurden mit CO_2 getötet. Zur Gewinnung von Trachealzellen wurde die Trachea entnommen, in 1mm lange Stücke zerschnitten und bei 37°C in einer Ca^{2+} -freien PSS-Lösung inkubiert, die 0.7 mg/ml Papain, 1 mg/ml 1,4-dithio-D,L-threitol und 1 mg/ml BSA (bovines Serumalbumin) enthielt. Nach 30 Minuten wurde die Lösung entfernt und die Gewebestücke für weitere 8-10 Minuten in einer Ca^{2+} -haltigen (50 μM) PSS-Lösung inkubiert, die jeweils 1 mg/ml Collagenase, 1 mg/ml Hyaluronidase und 1 mg/ml BSA enthielt. Durch Auf- und Absaugen mit einer Pasteurpipette wurden Einzelzellen aus dem Gewebe gelöst, von denen über 50 % relaxiert waren. Nur diese Zellen wurden innerhalb der nächsten 6 Stunden für elektrophysiologische Untersuchungen verwendet.

2.2.4 Elektrophysiologische Methoden

2.2.4.1 Die Patch-Clamp-Technik

Die *Patch-Clamp*-Technik wurde 1981 von Erwin Neher und Bert Sakmann als eine Verfeinerung der Spannungsklemme (Voltage-Clamp) entwickelt. Sie bietet die Möglichkeit, elektrische Ströme zu registrieren, welche durch einzelne oder durch die Gesamtheit der Ionenkanäle einer Einzelzelle fließen. Diese Ströme entstehen durch geladene Ionen, die durch die Zellmembran wandern. Bei diesem Verfahren wird eine dünne, zugespitzte und hitzepolierte Glaspipette (Patchpipette) benutzt, um einen elektrischen Kontakt mit der Zelloberfläche herzustellen. Zuvor wird diese Glaspipette mit Pipettenlösung gefüllt und mit einer mit dem Verstärker gekoppelten chlorierten Silberdrahtelektrode verbunden. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wird die Patchpipette nun an die Zelle herangefahren, und vorsichtig auf die Zellmembran aufgesetzt. Durch diesen Vorgang wird bereits eine elektrische Abdichtung („seal“) herbeigeführt. Durch vorsichtiges Ansaugen der Membran werden sehr hohe Widerstände im Gigaohmbereich („Gigaseals“) erreicht. Nach Erreichen des „Gigaseals“ wird der Unterdruck sofort wieder abgelassen. Durch den hohen Widerstand wird der Membranbereich, der sich nun unter der Öffnung der Glaspipette („Patch“) befindet, vom Hintergrundrauschen isoliert. Dadurch können kleine Ströme im pA-Bereich, wie Ionenkanäle sie aufweisen, dargestellt werden. Die zu untersuchenden Zellen befinden sich in einem Kulturgefäß mit Badlösung, in die eine zweite Elektrode, die Badelektrode, eingetaucht ist. Die Badelektrode ihrerseits ist auch mit dem Verstärker verbunden, so dass nun zwischen diesen beiden Elektroden eine Spannung angelegt werden kann. Dadurch ist es möglich, den „Patch“ spannungsabhängig zu untersuchen, wobei durch eine geeignete Schaltung das Membranpotential konstant gehalten wird („Clamp“). In Abbildung 2.3 ist ein vereinfachtes Schaltbild eines *Patch-Clamp*-Verstärkers dargestellt. Ein *Patch-Clamp*-Verstärker besteht aus zwei wichtigen Bestandteilen, dem Operationsverstärker (OPA, *operational amplifier*) mit sehr hohem Eingangswiderstand und dem Rückkopplungswiderstand R_f (f steht für feedback). Am (-)-Eingang des OPA liegt das Pipettenpotential

(U_{pip}), am (+)-Eingang die Kommandospannung = Sollspannung (U_{soll}), an. Nimmt man den Fall an, dass zwischen Pipettenspannung und Sollspannung eine Differenz besteht, so entsteht am Ausgang des OPA eine Spannung, die der Differenz der Eingangsspannungen proportional und extrem verstärkt ist. Es kommt zu einer Potentialdifferenz zwischen Punkt 2 und Punkt 1 (Abbildung 2.3). Deswegen fließt über den Rückkopplungswiderstand (R_f) ein Strom. Dabei entsteht am Rückkopplungswiderstand eine Spannung die proportional zum durchfließenden Strom ist. Diese Spannung wird dem Hauptverstärker zugeführt, und kann nach erfolgter Kalibrierung am Oszilloskop als Stromkurve sichtbar gemacht werden. Daraus erklärt sich der Name „Strom- Spannungswandler“. Der Strom, der durch den Rückkopplungswiderstand (R_f) fließt, kann nur in die Pipette fließen, da der Eingangswiderstand des OPA sehr hoch ist. Der Strom ändert das Membranpotential und wird solange fließen, bis das Pipettenpotential gleich der Sollspannung ist.

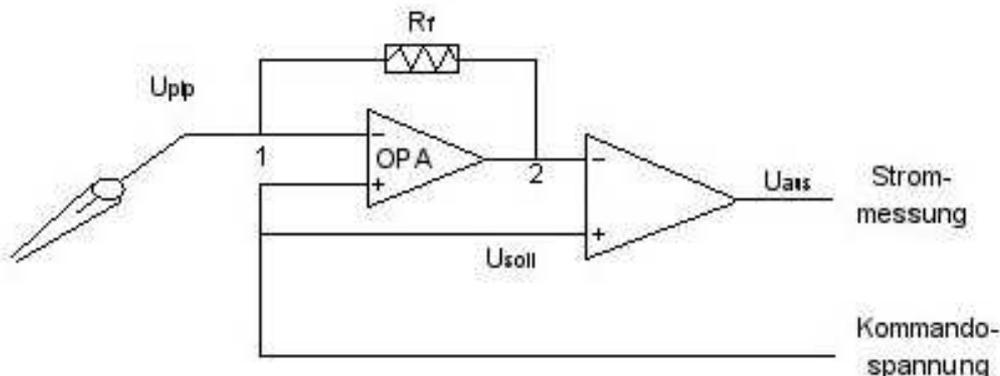


Abbildung 2.3 Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers

OPA: Operationsverstärker, R_f : Rückkopplungswiderstand, U_{soll} : Kommando- oder Sollspannung, U_{pip} : Pipettenpotential, U_{aus} : Ausgangsspannung proportional zum Strom

Während der Ausbildung zur *Whole-cell*-Konfiguration entsteht ein zusätzlicher Widerstand, der zwischen Silberdraht und Zellmembran liegt. Der sogenannte Serienwiderstand (R_s) entspricht nur im theoretisch idealen Fall dem Pipettenwiderstand (R_{pip}). Beim Öffnen der Zelle lagern sich Membranfragmente und zum Teil auch Zellorganellen in den

Mündungsbereich der Pipette an, so dass oft eine Verdopplung des reinen Pipettenwiderstandes (R_{pip}) erreicht wird, der im Verlauf eines Experimentes noch deutlich zunehmen kann. Zusätzlich führt jede Änderung der Kommandospannung zu Umladeprozessen der Pipetten- und Zellkapazität, die aufgrund von artifiziellen Ladeströmen, das eigentliche Messsignal stören. Diese Artefakte werden durch die Aktivierung eines Kompensationsschaltkreises ausgeschaltet. Um den Fehler durch den Serienwiderstand gering zu halten wird der Spannungsverlust über den Serienwiderstand R_s elektronisch mit einer entsprechenden Funktion des *Patch-Clamp*-Verstärkers kompensiert.

Für die Experimente wurden Mikroelektroden aus Borosilikat-Glaskapillaren mit innerem Filament (TW 150F-4, WPI; Außendurchmesser: 1.5 mm) an einem horizontal ziehenden DMZ-Universal Puller der Firma Zeitz hergestellt. Um eine bessere Abdichtung mit der Zellmembran zu erreichen, wurden die scharfkantigen Pipettenspitzen hitzepoliert und anschließend mit gefilterter (0.22 μm Spritzenfilter, Costar) Salzlösung gefüllt. Der Widerstand der Pipetten betrug 2-3 M Ω für *Whole-cell*-Messungen, sowie 6-12 M Ω für Einzelkanalableitungen (*Inside-out*-Konfiguration). Als Referenz diente eine Agarelektrode. Mit einem hydraulischen Mikromanipulator (WR-6, Narishige) konnte die Pipette unter 400facher Vergrößerung eines inversen Mikroskopes der Firma Zeiss (Axiovert 10) vorsichtig an transient transfizierte HEK293-Zellen geführt werden, wobei zuvor die Potentialdifferenz zwischen Pipette und Referenzelektrode („offset“) kompensiert wurde. Nach Berührung der Zelle wurde die Zellmembran angesaugt, bis ein hoher Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Zellmembran erzeugt wurde („Gigaseal“). Die so erhaltene Ausgangssituation wird *Cell-attached*-Konfiguration genannt. Die dabei gemessenen Ströme zeigten zwei kapazitative Artefakte (kapazitiver Strom) am Anfang und Ende des Kommandospannungspulses, die durch Umladeprozesse an Pipette und Zellmembran entstehen und vor Beginn der Messung kompensiert wurden. Diese Ausgangskonfiguration ermöglicht die Messung von Einzelkanalableitungen sowie den Wechsel in weitere *Patch-Clamp*-Konfigurationen. Durchbricht man durch ein kurzes Ansaugen das Membranstück unter der Patchpipette, resultiert die

Whole-cell-Konfiguration. Dadurch wird eine Spannungskontrolle über die gesamte Zellmembran möglich. Nach kurzer Zeit tauscht sich das Cytoplasma mit der Pipettenlösung aus. Wegen des viel größeren Volumens der Pipettenlösung im Verhältnis zum Volumen des Cytoplasmas werden klar definierte, aber auch artifizielle Verhältnisse des intrazellulären Milieus geschaffen. Da nun nicht nur der Membranfleck unter der Pipettenöffnung umgeladen werden musste, sondern die gesamte Fläche der Zellmembran führte dies zu einer Zunahme der kapazitiven Ströme, die manuell kompensiert wurden und dadurch die Zellkapazität bestimmt wurde. In die *Inside-out*-Konfiguration gelangt man, indem man nach einem *Cell-attached*-Patch die Pipette langsam von der Zelle abzieht und ein Membranstück ablöst, ohne das sich der Sealwiderstand merklich verändert. Dadurch bildet sich aus dem Membranstück ein Vesikel, der durch Luftkontakt aufplatzt. In dieser Konfiguration zeigt die Innenseite der Zellmembran zur Badlösung. Es lassen sich nun die einzelnen Kanalströme ohne cytosolische Komponenten messen. Wird die Pipette aus der *Whole-cell*-Konfiguration von der Zelloberfläche weg bewegt, erhält man die *Outside-out*-Konfiguration. Im Gegensatz zur *Inside-out*-Konfiguration weist jedoch die Außenseite der Zellmembran zur Badlösung. Die einzelnen *Patch-Clamp*-Konfigurationen sind in Abbildung 2.4 dargestellt.

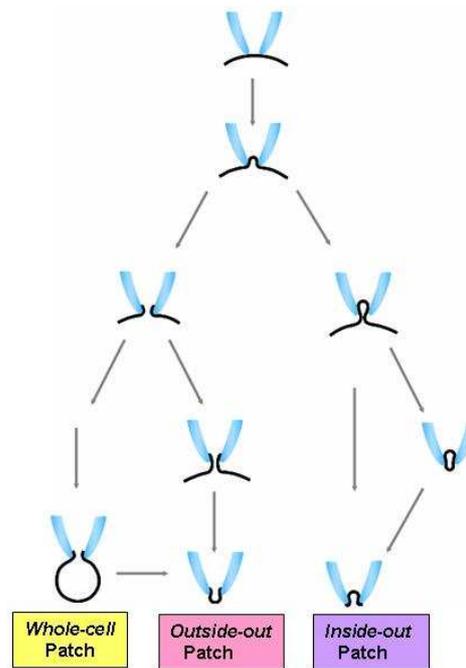


Abbildung 2.4 Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Patch-Clamp-Konfigurationen

Die Membranströme der Zellen wurden mit dem EPC-7 Verstärker (Modell L/M EPC-7, HEKA) aufgenommen, mit 10 kHz unter Verwendung einer 16 Bit AD-DA-Wandkarte und der Software ISO-3 (MFK) digitalisiert, mit einem 3 kHz Tiefpass-Filter gefiltert (10-Pol Bessel-Filter), und auf der Festplatte eines IBM-kompatiblen Computers gespeichert.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Versuche in der *Whole-cell*-, *Inside-out*- und *Outside-out*-Konfiguration durchgeführt, deren Spannungsprotokolle abhängig von den Versuchen zum Teil variieren konnten.

Für die Aufnahme von Strom-Spannungskurven in der *Whole-cell*-Konfiguration wurden vor und nach jedem Lösungswechsel mit Hilfe von rechnergesteuerten Spannungsprotokollen (Software ISO-3, MFK) Spannungspulse von 300 ms Dauer an die Patchmembran angelegt, die ausgehend von einem Haltepotential -10 mV in 10 mV-Schritten von -50 bis +80 mV oder in 20 mV-Schritten von -80 bis +80 mV geklemmt wurden.

In der *Inside-out*-Konfiguration wurden Ströme von einzelnen Kanälen und der Strom von vielen Kanälen (makroskopische Ströme) gemessen. Für die Messung von makroskopischen Strömen wurden die Zellen alle 5 Sekunden mit 300 ms dauernden Rechteckimpulsen von einem Haltepotential von -10 mV zuerst auf -100 mV und dann in 20 mV-Schritten auf +100 mV oder von -160 mV auf +160 mV geklemmt.

Zur Aufnahme von Einzelkanalmessungen in der *Inside-out*- und *Outside-out*-Konfiguration wurden die Zellen in 20 mV-Schritten von -60 mV auf +80 mV oder stabil auf +40 mV geklemmt.

2.2.4.2 Statistik und Auswertung der Daten

Die grafische und statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm SigmaPlot für Windows (Vers.11.0, SPSS Inc., USA). In allen Diagrammen wurde jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwertes (SE) aus einer Zahl von n Experimenten angegeben.

Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und Student's t-Test. Für wiederholte Messungen an einer Zelle wurde der gepaarte t-Test verwendet und für Messungen unterschiedlicher Zellen der ungepaarte t-Test. P-Werte < 0.05 wurden als signifikant angesehen.

Die Kanaloffenwahrscheinlichkeit (NP_o) wurde mit Hilfe der Software ISO-3 ermittelt. N steht dabei für die Anzahl der im „Patch“ enthaltenen Kanäle, P_o für die Öffnungswahrscheinlichkeit des einzelnen Kanals. Da in einem „Patch“ mehr als nur ein Ionenkanal vorhanden sein kann, ist es durchaus möglich, dass NP_o Werte > 1 annimmt.

Bestimmung der Stromdichte:

Zur Ermittlung der Stromdichte wurde während jeder *Patch-Clamp*-Untersuchung die Membrankapazität am EPC-7 (HEKA) ermittelt. Die Membrankapazität der Zelle ist ein Maß für die Größe ihrer Oberfläche. Wird der Strom auf die Zelloberfläche normalisiert, indem ein Quotient aus Stromamplitude und der ermittelten Membrankapazität gebildet wird, erhält man die Stromdichte (pA/pF). Zur Erstellung einer

Strom-Spannungskurve wurden die ermittelten Stromdichten den Testpotentials zugeordnet und die Datenpunkte einer Kurve angepasst.

Bestimmung der Leitfähigkeit:

Zur Berechnung der Leitfähigkeit (G) wurden nach dem Ohmschen Gesetz die Stromamplituden durch die auf die Ionen wirkende Triebkraft dividiert, die sich aus der Differenz des Testpotentials und des Gleichgewichtspotentials der betreffenden Ionenart ergibt.

$$G = \frac{I}{V_m - V_{rev}}$$

Hier stellt I die Stromamplitude und V_m das Testpotential (Spannung) dar. V_{rev} ist das Gleichgewichtspotential für K^+ , dass sich mit der Nernst-Gleichung aus den K^+ -Konzentrationen auf der Außen- sowie Innenseite der Membran berechnen lässt.

Die Leitfähigkeit (G) der Kanäle bei einem gegebenen Testpotential (V_m) konnte mit einer Boltzmann-Funktion beschrieben werden:

$$G = \frac{G_{max}}{\left\{ 1 + \exp\left(\frac{(V_{1/2} - V_m)}{k}\right) \right\}}$$

G_{max} ist die maximale Leitfähigkeit unter Kontrollbedingungen, $V_{1/2}$ bezeichnet den Aktivierungsmittelpunkt, also das Potential bei dem die Hälfte aller Kanäle geöffnet ist und k ist der Steigungsfaktor (*slope factor*) der Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung. Durch Division der Leitfähigkeiten (G) durch die maximale Leitfähigkeit (G_{max}) wurden nomalisierte Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen dargestellt.

2.2.4.3 Bad- und Pipettenlösungen

Für die *Whole-cell*-Ableitungen wurde eine Standard-Badlösung (Physiologische Salzlösung, PSS) mit folgender Zusammensetzung verwendet:

127 mM	NaCl
5.9 mM	KCl
2.4 mM	CaCl ₂
1.2 mM	MgCl ₂
10 mM	HEPES
11 mM	Glucose

pH = 7.4

Zusammensetzung der Standard-Pipettenlösung für *Whole-cell*-Ableitungen:

126 mM	KCl
6.0 mM	NaCl
1.2 mM	MgCl ₂
5.0 mM	EGTA
11 mM	Glucose
3 mM	ATP (K-Salz)
0.1 mM	GTP (Na-Salz)
10 mM	HEPES

pH = 7.4

Für Messungen an HEK293-Zellen im *Inside-out*-Modus wurden folgende Zusammensetzungen für Bad- und Pipettenlösung verwendet:

Badlösung:

126 mM	KCl
6.0 mM	NaCl
1.2 mM	MgCl ₂
5.0 mM	EGTA
11 mM	Glucose
3 mM	ATP (K-Salz)
0.1 mM	GTP (Na-Salz)
10 mM	HEPES

pH = 7.4

Pipettenlösung:

127 mM	NaCl
5.9 mM	KCl
2.4 mM	CaCl ₂
1.2 mM	MgCl ₂
10 mM	HEPES
11 mM	Glucose

pH = 7.4

Die Bad- und Pipettenlösung für *Inside-out*-Messungen an nativen Zellen wurde sich wie folgt zusammengesetzt:

Badlösung:

126 mM	KCl
6.0 mM	NaCl
1.2 mM	MgCl ₂
5.0 mM	EGTA
11 mM	Glucose
3 mM	ATP (K-Salz)
0.1 mM	GTP (Na-Salz)
10 mM	HEPES

pH = 7.4

Pipettenlösung:

132 mM	KCl
6 mM	NaCl
1.2 mM	MgCl ₂
5.0 mM	EGTA
11 mM	Glucose
10 mM	HEPES

pH = 7.4

Für die Versuche im *Outside-out*-Modus wurde die Bad- und Pipettenlösung für *Inside-out*-Messungen an nativen Zellen verwendet, nur mit dem Unterschied dass die Badlösung als Pipettenlösung und die Pipettenlösung als Badlösung verwendet wurde.

Die freie Ca^{2+} -Konzentration für Versuche an HEK293-Zellen betrug $1 \mu\text{M}$ und an nativen Zellen $0.3 \mu\text{M}$. Die entsprechende Menge an zuzugebendem CaCl_2 wurde mit Hilfe eines Computerprogramms anhand von Bindungsdaten errechnet und durch entsprechende Fura-2-Fluoreszenz Messungen kontrolliert (Fabiato, 1988, Mermi et al., 1991).

3 ERGEBNISSE

3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung des BK_A-Kanals

Zur Untersuchung der Eigenschaften und zur Analyse der Regulation des BK-Kanals durch die Proteinkinase C (PKC) wurden BK-Kanäle transient in HEK293-Zellen exprimiert und mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik untersucht. Soweit nicht anders vermerkt, wurde für die folgenden Versuche die Isoform A (BK_A) des BK-Kanals verwendet. Um auszuschließen, dass native HEK293-Zellen BK_A-Kanäle exprimieren, wurden native und transient mit dem BK_A-Kanal transfizierte HEK293-Zellen in der *Whole-cell*-Konfiguration der *Patch-Clamp*-Technik analysiert und miteinander verglichen. Ausgehend von einem Haltepotential von -10 mV wurden Spannungsimpulse von 300 ms Dauer von -80 bis +80 mV in 20 mV-Schritten an die Messpipette angelegt und der resultierende Strom gemessen. Abbildung 3.1 zeigt repräsentative Originalaufnahmen von Strömen. Dabei geht aus der Abbildung hervor, dass die Depolarisation von nicht-transfizierten HEK293-Zellen nur geringe Auswärtsströme induziert, die einen mittleren Stromwert von 25.3 ± 3.4 pA bei einem Messpotential von +80 mV aufwiesen. Im Vergleich zu nicht-transfizierten HEK293-Zellen führte die Expression des BK_A-Kanals zu wesentlich höheren Stromwerten, die bei +80 mV 1976.8 ± 153.2 pA (n=27) erreichten (Abbildung 3.1B). Der K⁺-Auswärtsstrom in nicht-transfizierten Zellen betrug damit nur 1.3 % des Stromes von transfizierten Zellen. Die Gabe von 300 nM Iberiotoxin, einem spezifischen BK-Kanal Inhibitor, hatte keinen Effekt auf den K⁺-Auswärtsstrom von nicht-transfizierten Zellen (nicht dargestellt), was beweist, dass HEK293-Zellen keine BK_A-Kanäle exprimieren. Auswärtsströme transfizierter Zellen wurden daher als BK-Ströme, I_{BK} , betrachtet.

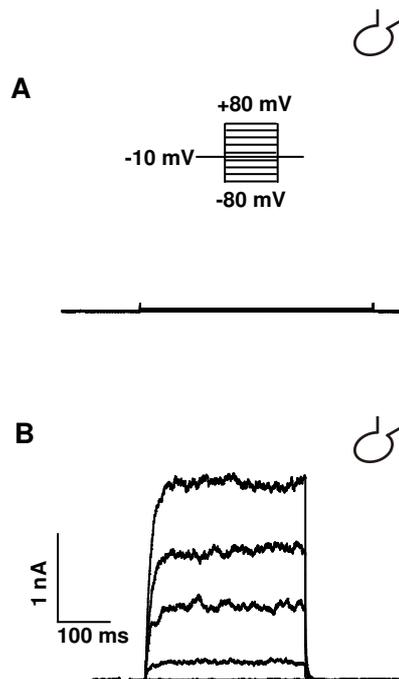


Abbildung 3.1 Charakterisierung des in HEK293-Zellen exprimierten BK_A-Kanals

Dargestellt sind repräsentative Auswärtsströme die mit der Whole-cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik gemessen wurden. Ausgehend von einem Haltepotential von -10 mV erfolgten schrittweise Depolarisationen um +20 mV; von -80 auf +80 mV (siehe eingefügtes Pulsprotokoll). Die Depolarisationsdauer betrug jeweils 300 ms. (A) Auswärtsströme von nicht-transfizierten HEK293-Zellen (B) Auswärtsströme von HEK293-BK_A-Zellen. [Ca²⁺]_i in der Pipettenlösung betrug 1 μM. Ⓞ = Whole-cell-Konfiguration

Zur Charakterisierung des BK_A-Kanals in HEK293-Zellen wurden folgende Eigenschaften näher untersucht:

- die Spannungsabhängigkeit
- die Einzelkanalleitfähigkeit und
- die Ca²⁺-Abhängigkeit

Spannungsabhängigkeit des BK_A-Kanals:

Zur Untersuchung der Spannungsabhängigkeit wurden Einzelkanalmessungen in der *Inside-out*-Konfiguration an HEK293-Zellen mit niedriger BK_A-Kanalexpression durchgeführt. Hierbei wurde das Membranpotential in 20 mV-Schritten von -60 auf +80 mV erhöht. Die Versuche wurden bei symmetrischen K⁺-Konzentrationen von 140 mM in der Bad- und Pipettenlösung durchgeführt. In Abbildung 3.2 sind die

entsprechenden Einzelkanalöffnungen des BK_A -Kanals dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass mit steigendem Membranpotential die Aktivität des BK_A -Kanals, d.h. die Anzahl der Ionenkanalöffnungen pro Zeit (NP_o) zunimmt. Die Stromamplitude verändert sich dabei potentialabhängig.

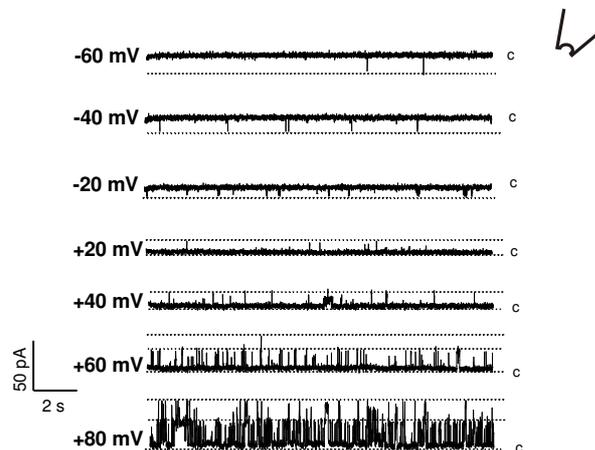


Abbildung 3.2 Spannungsabhängigkeit des BK_A -Kanals

Einzelkanalmessungen bei Messpotentialen von -60 mV bis +80 mV. Die Untersuchungen wurden bei symmetrischen K^+ -Konzentrationen von 140 mM durchgeführt. c (closed) stellt den geschlossenen Zustand des Kanals dar. Die Kanaloffenwahrscheinlichkeit (NP_o) und die Stromamplitude steigt mit zunehmender Depolarisation an.
 L=Inside-out-Konfiguration

Einzelkanalleitfähigkeit des BK_A -Kanals:

Die Leitfähigkeit eines Ionenkanals ist ein Maß für die Fähigkeit, mit der einzelne Ionen einen Kanal passieren können. Zur Bestimmung der Leitfähigkeit wurden Ionenströme in der *Inside-out*-Konfiguration bei symmetrischen K^+ -Konzentrationen von 140 mM und bei verschiedenen Potentialen zwischen -60 und +60 mV gemessen. In Abbildung 3.3 sind die ermittelten Stromamplituden gegen die Spannung aufgetragen. Dabei verhält sich die Strom-Spannungsbeziehung linear. Wird die Steigung der Regressionsgeraden ermittelt, lässt sich die mittlere Leitfähigkeit berechnen, die hier einen Wert von 243.3 ± 3.0 pS erreichte ($n=9$). Dieser Wert entspricht dem in der Literatur beschriebenen Leitfähigkeitsbereich des BK-Kanals, der zwischen 100 - 250 pS liegt (Hille, 1992).

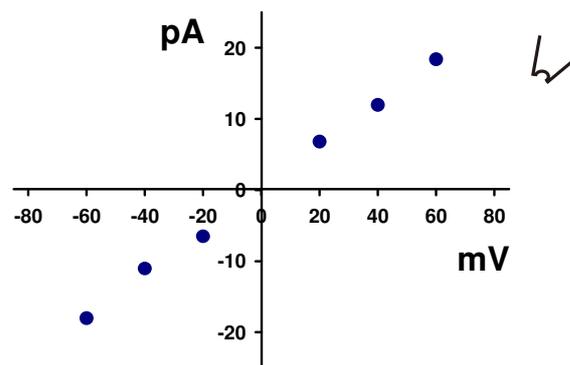


Abbildung 3.3 Leitfähigkeitsbestimmung des BK_A-Kanals

Strom-Spannungs-Beziehung des in HEK293-Zellen transfizierten BK_A-Kanals in der *Inside-out*-Konfiguration. Messungen wurden bei einer symmetrischen K⁺-Konzentration von 140 mM durchgeführt. Die Ermittlung der Steigung der Geraden ergibt die Leitfähigkeit, die hier bei 243.3 ± 3.0 pS lag, Mittelwerte von 9 Messungen. ✓ = *Inside-out*-Konfiguration

Ca²⁺-Abhängigkeit des BK_A-Kanals:

Zur Charakterisierung der Ca²⁺-Abhängigkeit des BK_A-Kanals wurden Untersuchungen in der *Inside-out*-Konfiguration mit steigenden Ca²⁺-Konzentrationen von 0.3 bis 10 μM (0.3; 1; 3; 10) durchgeführt. Für diese Untersuchung ist die *Inside-out*-Konfiguration von Vorteil, da hier die cytoplasmatische Seite zur Badlösung zeigt, und die jeweils gewählten Ca²⁺-Konzentrationen die Kanäle direkt erreichen können. Die in Abbildung 3.4 dargestellten Versuche wurden an HEK293-Zellen mit hoher Kanalexpression durchgeführt. Ausgehend von einem Haltepotential von -10 mV wurde die Spannung in 20 mV-Schritten und einer Dauer von 300 ms von -160 auf +160 mV erhöht. Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen wurden auf das Maximum normalisiert und an eine Boltzmann-Funktion angepasst. Die Leitfähigkeit wurde aus makroskopischen BK_A-Strömen berechnet. In Abbildung 3.4 sind die entsprechenden normalisierten Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen bei vier verschiedenen Ca²⁺-Konzentrationen dargestellt.

In jeweils acht Messungen wurde mit Zunahme der Ca²⁺-Konzentration eine Verschiebung der Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung nach links beobachtet. Das halbmaximale Aktivierungspotential ($V_{1/2}$) wurde von 99.0 ± 2.4 mV (0.3 μM Ca²⁺) auf 2.0 ± 3.6 mV (10 μM Ca²⁺) verschoben. Das

halbmaximale Aktivierungspotential ($V_{1/2}$) ist das Potential, bei dem die Leitfähigkeit 50 % des Maximums erreicht.

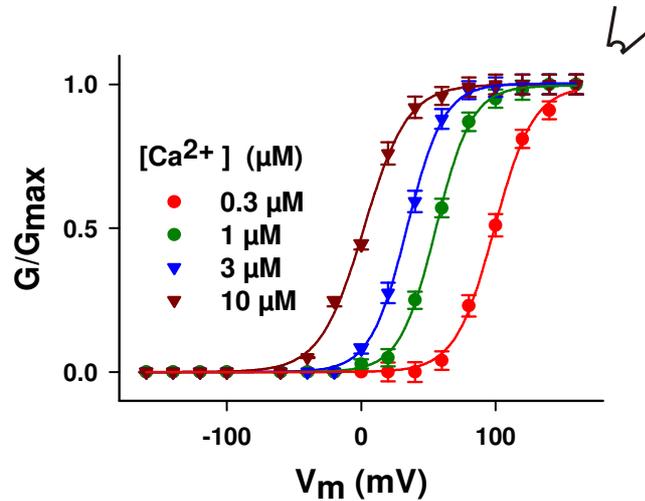


Abbildung 3.4 Ca^{2+} -Abhängigkeit des BK_A -Kanals

Dargestellt sind normalisierte Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen von acht Messungen bei unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen: 0.3, 1, 3, 10 μM . Mit steigender Ca^{2+} -Konzentration wurde das $V_{1/2}$ nach links verschoben. ✓=Inside-out-Konfiguration

Aus den Ergebnissen, die in Abbildung 3.1 - 3.4 dargestellt sind, kann gefolgert werden, dass BK_A -Kanäle, die in HEK293-Zellen transient exprimiert wurden, die typischen elektrophysiologischen Merkmale (Einzelkanalleitfähigkeit, Spannungs- und Ca^{2+} -Abhängigkeit) aufweisen wie BK-Kanäle in nativem Gewebe.

3.2 Regulation des BK_A-Kanals durch die Proteinkinase C

Im nächsten Schritt wurde die Regulation des BK_A-Kanals durch die PKC untersucht. Es ist bekannt, dass die Aktivität von BK-Kanälen neben dem Membranpotential und Ca²⁺ auch durch Proteinkinasen moduliert wird (Schubert and Nelson, 2001). Um zu prüfen welche Wirkung die PKC auf transient in HEK293-Zellen exprimierte BK_A-Kanäle hat, wurden Experimente in der *Whole-cell*- und *Inside-out*-Konfiguration der *Patch-Clamp*-Technik durchgeführt.

3.2.1 Wirkung von Phorbol ester auf den BK_A-Strom bei unterschiedlichen Ca²⁺-Konzentrationen

Im Folgenden wurde die Wirkung von Phorbol estern auf den BK_A-Kanalstrom untersucht. Da Phorbol ester Ca²⁺-abhängige PKC's aktivieren, sollte zusätzlich überprüft werden, ob die Wirksamkeit der Phorbol ester durch Erhöhung der Ca²⁺-Konzentrationen in der Pipettenlösung (0.3, 1 und 3 μM) verstärkt wird. Als Aktivator der PKC wurde der Phorbol ester 4β-Phorbol 12-myristat, 13-acetat (PMA, 100 nM) verwendet. BK_A-Kanalströme (I_{BK}) wurden in der *Whole-cell*-Konfiguration gemessen. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Messungen zu ermöglichen, wurden die ermittelten Stromwerte auf die Zelloberfläche normalisiert (Stromdichte = pA/pF). Dadurch lassen sich die durch die Zellgröße bedingten Unterschiede in der Stromamplitude ausgleichen. In Abbildung 3.5A, C und E sind die entsprechenden Strom-Spannungskurven dargestellt, die sich aus den Mittelwerten von Einzelmessungen ergaben.

100 nM PMA induzierte bei allen Potentialen eine Hemmung des BK_A-Stroms. Bei einem Potential von +80 mV wurde die Stromdichte bei 0.3 μM Ca²⁺ von 86.8 ± 1.6 pA/pF auf 67.0 ± 1.2 pA/pF (n=5), bei 1 μM Ca²⁺ von 125.3 ± 1.5 pA/pF auf 65.5 ± 4.0 pA/pF (n=6) und bei 3 μM Ca²⁺ von 747.7 ± 17.6 pA/pF auf 225.4 ± 22.8 pA/pF (n=5) reduziert. Dies bedeutet, dass die Hemmung des BK_A-Kanalstroms durch PMA mit zunehmender Ca²⁺-Konzentration größer wird. Wie in Abbildung 3.5 B, D und F gezeigt,

kommt es nach Gabe von 100 nM 4- α -PMA, einem inaktiven Analogon der PMA, zu keiner signifikanten Änderung gegenüber dem Kontrollstrom.

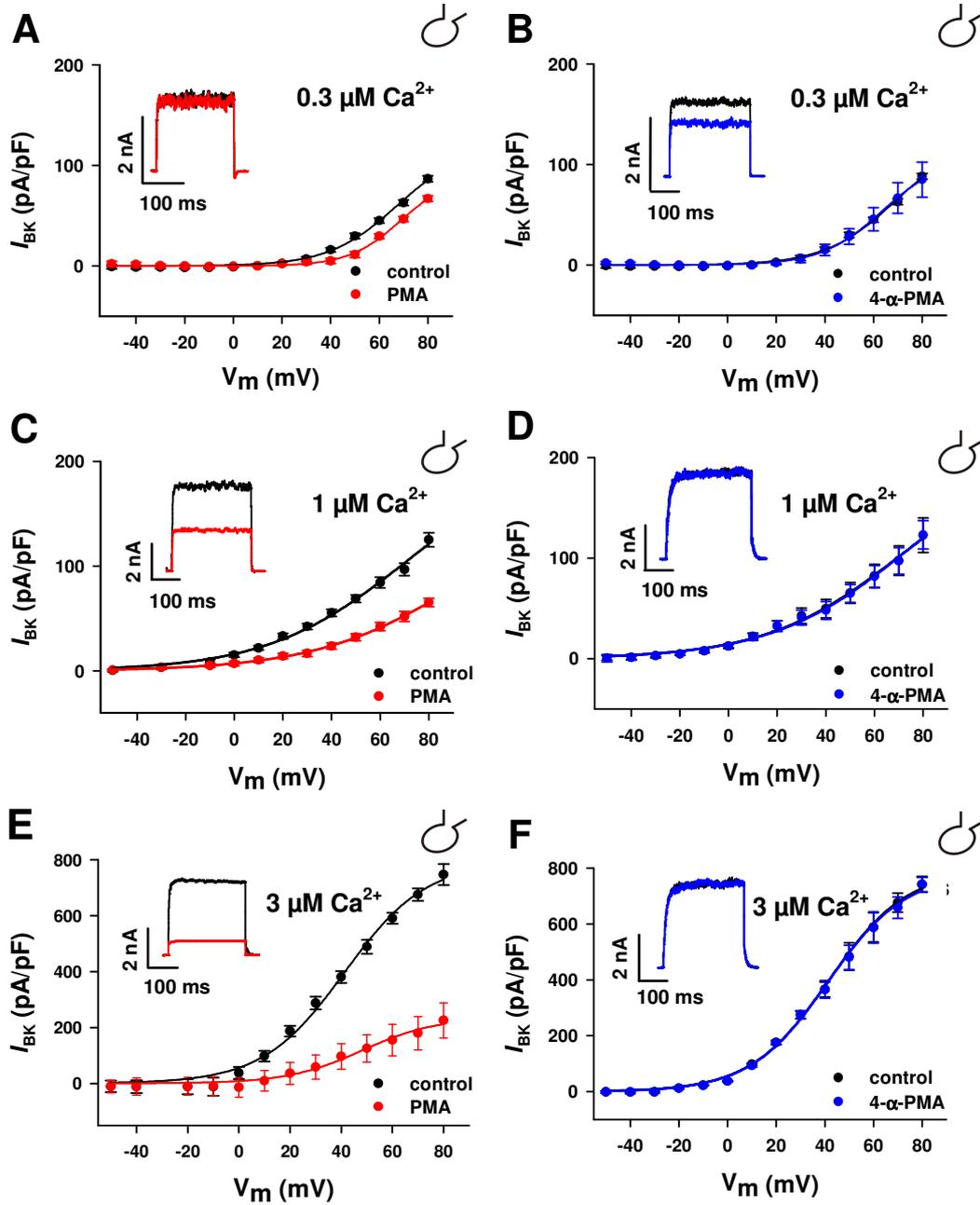


Abbildung 3.5 Hemmung des BK_A -Stroms durch den Phorbol ester PMA

Dargestellt sind Strom-Spannungs-Beziehungen vor (control) und nach Superfusion mit dem Phorbol ester PMA (100 nM) bei unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen in der Pipettenlösung: A: $0.3 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ($n=5$); C: $1 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ($n=6$); E: $3 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ($n=5$)

Aufgetragen ist die angelegte Messspannung in mV (V_m) gegen die Stromdichte I_{BK} in pA/pF. In B ($n=5$), D ($n=8$) und F ($n=6$) ist die fehlende Wirkung des inaktiven Analogons des Phorbol esters dargestellt. Originalströme bei einem Messpotential von +80 mV sind oberhalb der I/V-Kurven dargestellt. \circ = Whole-cell-Konfiguration

Die prozentuale Hemmung des I_{BK} durch PMA bei einem Messpotential von +80 mV ist im Säulendiagramm der Abbildung 3.6 dargestellt. Sie betrug bei 0.3 μM Ca^{2+} $22.8 \pm 0.6 \%$ und stieg mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration auf $48.6 \pm 6.1 \%$ bei 1 μM Ca^{2+} und auf $70.3 \pm 7.9 \%$ bei 3 μM Ca^{2+} an.

Die Ergebnisse zeigen, dass PMA eine Hemmung der Aktivität des BK_A -Kanals vermittelt, die mit Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration verstärkt wird. Die Erhöhung des Hemmeffektes durch Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration deutet auf die Beteiligung von Ca^{2+} -abhängigen PKC's (cPKC) hin.

Für alle weiteren Untersuchungen in HEK293-Zellen wurde eine intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von 1 μM verwendet. Höhere Ca^{2+} -Konzentrationen führten insbesondere bei Depolarisationen im positiven Bereich häufiger zu Ruptur der Zelle.

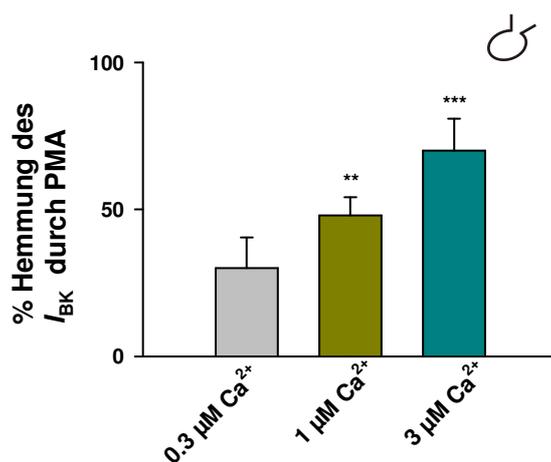


Abbildung 3.6 Hemmung der BK_A -Kanalaktivität durch PMA

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE der prozentualen Hemmung des I_{BK} durch PMA (100 nM) bei Ca^{2+} -Konzentrationen von 0.3 μM ($n=5$), 1 μM ($n=6$) und 3 μM ($n=5$) in der Pipettenlösung. ** $p < 0.01$ verglichen gegenüber 0.3 μM Ca^{2+} ; *** $p < 0.001$ verglichen gegenüber 0.3 μM Ca^{2+} . C = Whole-cell-Konfiguration

3.2.2 Die PMA-induzierte Hemmung des I_{BK} wird durch PKC-Inhibitoren aufgehoben

Um sicherzustellen, dass der PMA-induzierte Hemmeffekt auf den BK_A -Strom tatsächlich über die PKC vermittelt wird, wurden Kontrolluntersuchungen mit PKC-Inhibitoren durchgeführt.

Als Inhibitoren wurden Gö 6976 und Ro 31-8220 verwendet, wobei Gö 6976 ein selektiver Inhibitor der Ca^{2+} -abhängigen α - und β_1 -Isoformen der PKC ist (Martiny-Baron et al., 1993), während Ro 31-8220 alle PKC-Isoformen hemmt (Wilkinson et al., 1993).

Nach der Messung des Kontrollstroms wurden die Zellen mit 1 μ M Gö 6976 bzw. 1 μ M Ro 31-8220 für 5 Minuten superfundiert. Danach wurde in Anwesenheit der PKC-Inhibitoren 100 nM PMA appliziert. Wie aus Abbildung 3.7 ersichtlich, konnte durch die PKC-Inhibitoren Gö 6976 und Ro 31-8220 der Hemmeffekt von PMA vollständig aufgehoben werden. Die PKC-Inhibitoren hatten selbst keinen Effekt auf den BK_A -Strom (nicht dargestellt). Bei einem Potential von +80 mV betrug der Kontrollstrom 121.7 ± 0.8 pA/pF vor und 120.8 ± 1.4 pA/pF ($n=7$) nach Gabe von 1 μ M Gö 6976. In ähnlicher Größenordnung lag die Stromdichte vor (113.5 ± 8.0 pA/pF) und nach Gabe von 1 μ M Ro 31-8220 (117.8 ± 7.1 pA/pF, $n=7$). Der Verlust des PMA-induzierten Hemmeffektes durch Gö 6976 bestätigt die Vermutung, dass Ca^{2+} -abhängige PKC's für den Hemmeffekt von PMA verantwortlich sind, da Gö 6976 ein spezifischer Inhibitor dieser PKC's ist.

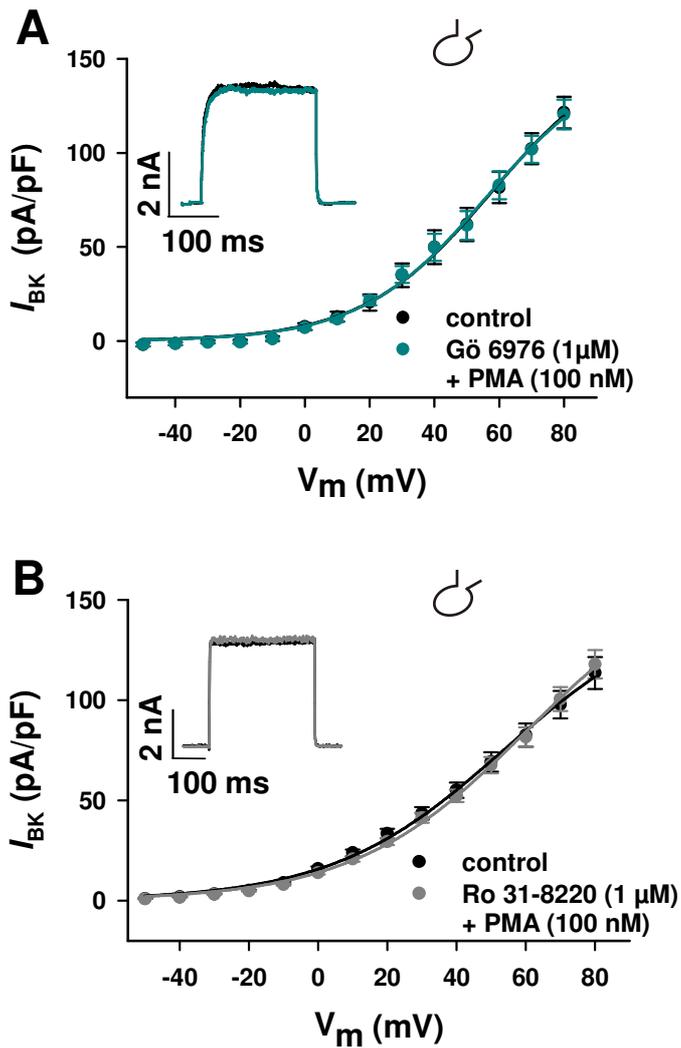


Abbildung 3.7 Gö 6976 und Ro 31-8220 unterdrücken den PMA-induzierten Hemmeffekt auf I_{BK}

Aufgetragen sind die mittleren Stromdichten von jeweils sieben Messungen (A und B) gegen die entsprechenden Messpotentiale. Zusätzlich sind repräsentative Originalströme bei einem Potential von +80 mV dargestellt. Zunächst wurden Kontrollströme gemessen (control). 5 Minuten nach Gabe von 1 μ M Gö 6976 (A) bzw. 1 μ M Ro 31-8220 (B) konnte durch die Gabe von 100 nM PMA keine Hemmung des Stromes induziert werden. Ⓞ = Whole-cell-Konfiguration

3.2.3 Effekte der katalytischen Untereinheit der PKC auf I_{BK}

Um den Hemmeffekt der PKC auf den BK_A -Strom auch direkt zu zeigen, wurden zusätzlich Versuche unter Verwendung der katalytischen Untereinheit der PKC durchgeführt. Die in Abbildung 3.8 gezeigten Versuche wurden in der *Inside-out*-Konfiguration durchgeführt. Ausgehend von einem Haltepotential von -10 mV wurden Potentialänderungen von -100 auf +100 mV in 20 mV-Schritten ausgelöst. Die entsprechenden Leitfähigkeiten wurden gegen die Spannung aufgetragen und an eine Boltzmann-Funktion angepasst.

Nach der Messung des Kontrollstroms wurde die cytoplasmatische Seite der Zellen mit 30 nM PKC superfundiert. Wie aus Teil A der Abbildung ersichtlich, führte die Applikation der PKC bei allen Potentialen zu einer Reduzierung der Leitfähigkeit gegenüber dem Kontrollstrom. Bei +80 mV betrug die Leitfähigkeit aus sieben Messungen 13.7 ± 0.7 nS. Nach Gabe von 30 nM PKC sank sie signifikant auf 5.9 ± 0.5 nS ab, was einer Hemmung um 57.2 ± 3.4 % entspricht. In Abbildung 3.8B wurden die beiden Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen aus Teil A normalisiert. Es zeigte sich, dass die PKC-induzierte Hemmung keinen signifikanten Einfluss auf das halbmaximale Aktivierungspotential ($V_{1/2}$) hatte, es betrug 51.6 ± 4.6 mV vor und 50.9 ± 3.7 mV nach Gabe der PKC. Um zu beweisen, dass die Hemmung des BK_A -Stroms tatsächlich auf einen PKC-Effekt beruht, wurden Messungen 1) in Anwesenheit des PKC Pseudosubstrat-Inhibitors (PKC₁₉₋₃₁) und 2) nach Hitzedenaturierung der PKC durchgeführt. Wie in Abbildung 3.8C dargestellt, wird die PKC-induzierte Hemmung des BK_A -Kanals in Anwesenheit von 5 μ M des Inhibitor-Peptids PKC₁₉₋₃₁ aufgehoben. In sieben Messungen betrug die mittlere Leitfähigkeit des Kontrollstroms bei einem Potential von +80 mV 12.8 ± 0.8 nS vor und 12.2 ± 0.6 nS nach Gabe von 30 nM PKC plus 5 μ M PKC₁₉₋₃₁.

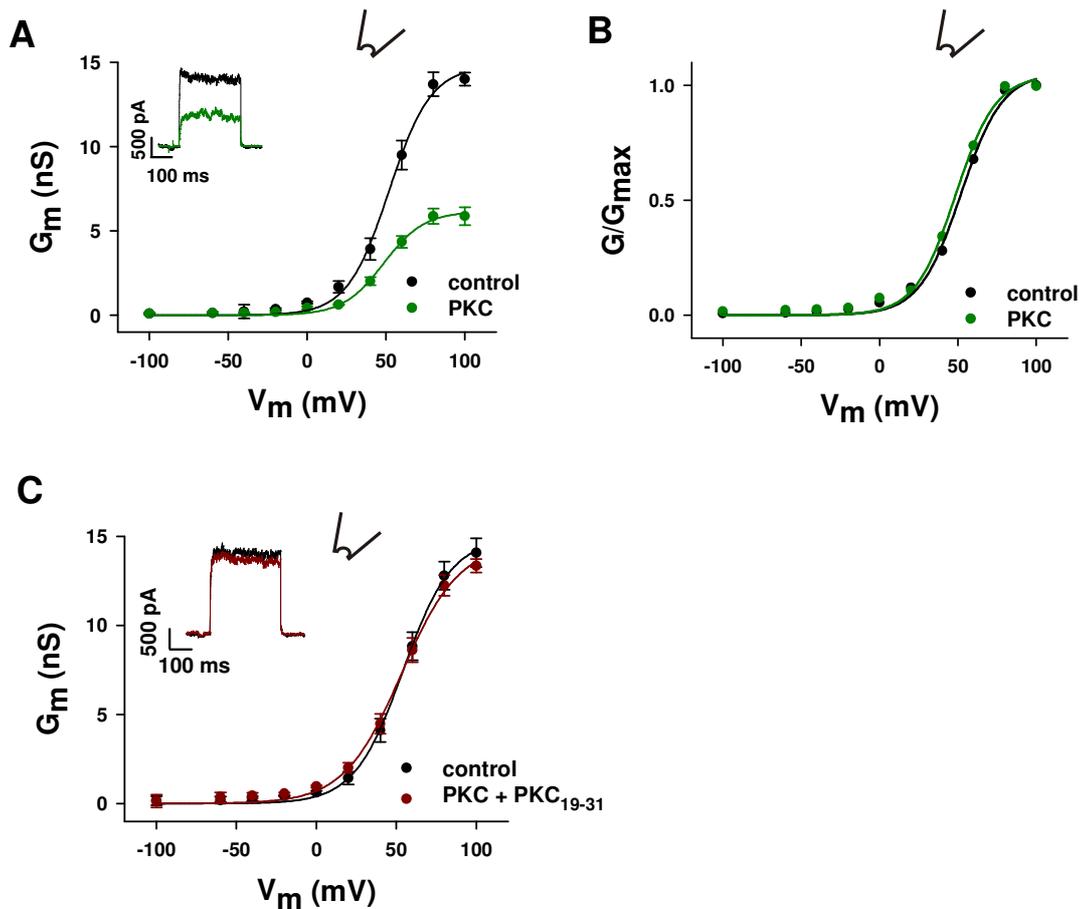


Abbildung 3.8 Hemmung des BK_A-Kanalstroms durch die PKC

Dargestellt sind Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen. A: Der Kontrollstrom (control, schwarz) wurde nach Gabe von 30 nM PKC bei einem Potential von +80 mV um $57.2 \pm 3.4\%$ reduziert (grün, $n=7$). In B wurden die mittleren Leitfähigkeiten aus A auf das Maximum normalisiert. Das halbmaximale Aktivierungspotential wurde durch die Hemmung nicht verändert. C: Als Negativkontrolle wurden 30 nM PKC zusammen mit 5 μ M PKC-Inhibitor-Peptid (PKC₁₉₋₃₁) verwendet (braun, $n=7$). Originalströme bei einem Messpotential von +80 mV sind oberhalb der G/V-Kurven dargestellt. control= Kontrolle; ✓=Inside-out-Konfiguration

Der Verlust des Hemmeffektes nach Hitzedenaturierung der PKC ist in Abbildung 3.9 dargestellt. In dem Säulendiagramm sind die Mittelwerte der Leitfähigkeit von fünf Messungen aufgetragen, die bei einem Potential von +80 mV erhalten wurden. Die Leitfähigkeit wurde nicht signifikant beeinflusst (10.7 ± 1.7 nS vor und 10.5 ± 1.6 nS nach Gabe der denaturierten PKC).

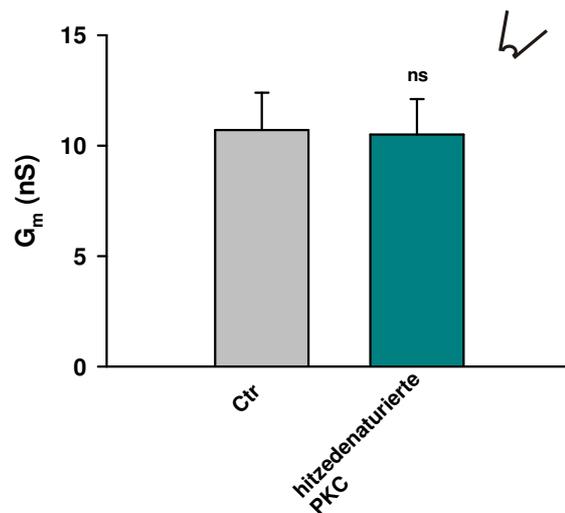


Abbildung 3.9 Verlust des Hemmeffektes durch Hitzedenaturierung der PKC

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE der Leitfähigkeit aus fünf Messungen bei einem Potential von +80 mV. Ctr: Kontrolle. Die Hitzedenaturierung der PKC führt zu einem Verlust des Hemmeffektes. ns= nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (Ctr). ✓=Inside-out-Konfiguration

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl durch die direkte Superfusion mit der katalytischen Untereinheit der PKC als auch durch die indirekte Aktivierung der PKC durch PMA der BK_A -Strom gehemmt wird. Des Weiteren war die PMA-induzierte Hemmung Ca^{2+} -abhängig.

Um zu überprüfen, ob die Hemmung des I_{BK} auf einer Abnahme der Einzelkanalleitfähigkeit und/oder auf einer Abnahme der Kanaloffenwahrscheinlichkeit (NP_o) beruht, wurden HEK293-Zellen mit niedriger BK_A -Kanalexpression in der *Inside-out*-Konfiguration vor und nach Superfusion mit 30 nM PKC bzw. PKC in Anwesenheit des Inhibitor-Peptids PKC_{19-31} unter symmetrischen K^+ -Bedingungen (140 mM) untersucht. Abbildung 3.10A zeigt repräsentative Einzelkanalmessungen des BK_A -Kanals bei einem Haltepotential von +40 mV. Die Gabe der PKC führte zu einer NP_o -Abnahme von 2.9 auf 0.6. Die Einzelkanalleitfähigkeit wurde dabei nicht beeinflusst. Diese betrug bei einem Potential von +40 mV 242.8 ± 11.6 pS (n=13) vor und 241.3 ± 12.9 pS (n=13) nach Gabe von PKC (Abbildung 3.10B). Wurde der *Inside-out*-Patch in Anwesenheit von 5 μ M des PKC-Inhibitors PKC_{19-31} und 30 nM der PKC superfundiert, kam es zu einem kompletten Verlust des Hemmeffektes. Das Säulendiagramm in Abbildung 3.10C zeigt, dass der mittlere NP_o -Wert der Kontrolle nach Gabe von 30 nM PKC von 2.3 ± 0.3 auf 1.1 ± 0.1 (n=6) reduziert wird. Die PKC-induzierte Hemmung wird in Anwesenheit von PKC_{19-31} vollständig

unterdrückt, der entsprechende NP_o -Wert von 2.1 ± 0.3 ($n=5$) unterscheidet sich nicht signifikant von der Kontrolle.

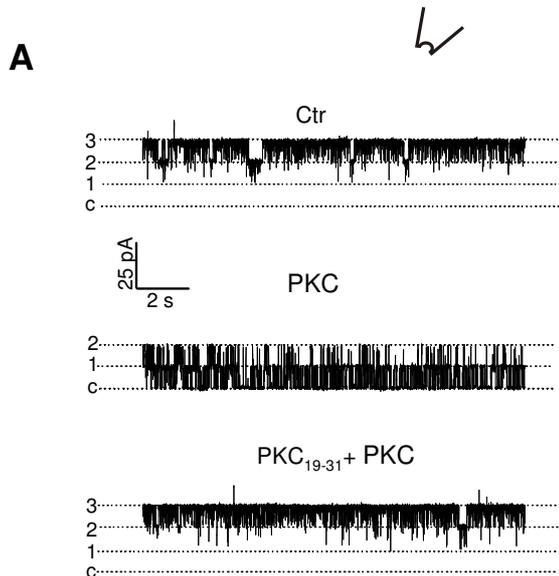
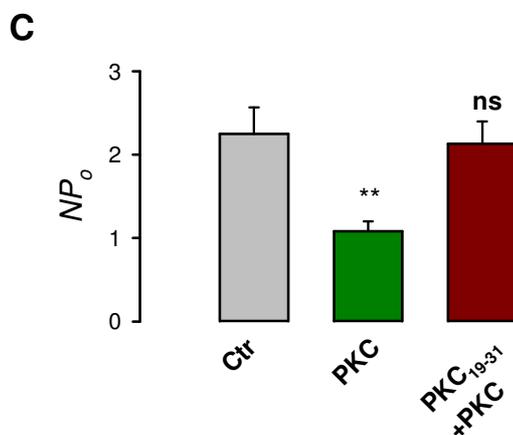
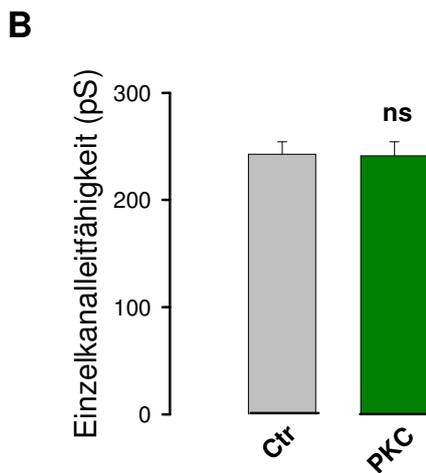


Abbildung 3.10 Wirkung der PKC auf die Kanaloffenwahrscheinlichkeit (NP_o)

A: Einzelkanalmessungen in der Inside-out-Konfiguration bei +40 mV und symmetrischen K^+ -Konzentrationen (140 mM). Die Gabe von 30 nM PKC führte zu einer Reduzierung des NP_o -Wertes, während die PKC in Anwesenheit des PKC-Inhibitors PKC_{19-31} (5 μ M) zu keiner Änderung des NP_o -Wertes gegenüber der Kontrolle führte. c (closed): geschlossener Zustand des Kanals. B: Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE der Einzelkanalleitfähigkeit vor (Ctr= Kontrolle; $n=13$) und nach Gabe der PKC ($n=13$). C: Mittelwerte \pm SE der NP_o -Werte bei einem Potential von +40 mV. Ctr ($n=11$); PKC ($n=6$); PKC+PKC₁₉₋₃₁ ($n=5$); NP_o : ** $p < 0.01$ verglichen gegenüber der Kontrolle (Ctr). ns= nicht signifikant gegenüber der Ctr. ✓=Inside-out-Konfiguration



3.3 Ser¹¹⁵¹ ist für die PKC-induzierte Hemmung essentiell

Der C-Terminus der α -Untereinheit des BK_A-Kanals enthält ein prominentes Tandem PKC-Phosphorylierungsmotiv (R-X-K-S¹¹⁵¹-R-X-S¹¹⁵⁴-R-X-K, Kennelly and Krebs, 1991). In Abbildung 3.11 ist das Tandemmotiv der Isoform A des BK-Kanals in der C-terminalen Aminosäuresequenz (A) und in einem Topologie-Modell der α -Untereinheit dargestellt (B). Zusätzlich ist in Teil A der Abbildung die C-terminale Aminosäuresequenz einer weiteren Isoform (BK_C) des BK-Kanals dargestellt. Dieser Isoform fehlen im Vergleich zur Isoform A die letzten 23 C-terminalen Aminosäuren und somit auch das Ser¹¹⁵¹ PKC-Phosphorylierungsmotiv. Sie unterscheidet sich zusätzlich in den letzten drei Aminosäuren von der BK_A-Isoform. Um herauszufinden, ob eine Phosphorylierung des Tandemmotivs für die PKC-induzierte Hemmung verantwortlich ist, wurde eine Kanalmutante eingesetzt, deren Ser¹¹⁵¹ und Ser¹¹⁵⁴ gegen Alanin (S¹¹⁵¹A und S¹¹⁵⁴A) ersetzt wurde. Eine Phosphorylierung durch die PKC ist somit an diesen Stellen nicht mehr möglich.

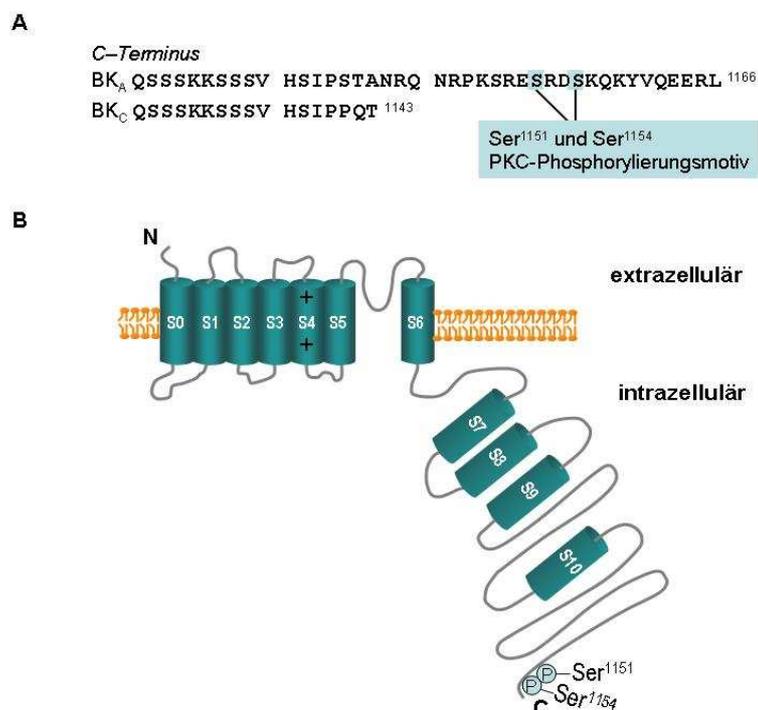


Abbildung 3.11 C-Terminus und Topologie-Modell der α -Untereinheit des BK-Kanals

A: Dargestellt ist die C-terminale Aminosäuresequenz der Isoform A und der trunkierten Isoform C. Das Tandem PKC-Phosphorylierungsmotiv Ser¹¹⁵¹ und Ser¹¹⁵⁴ ist blau unterlegt. B: Topologie-Modell der α -Untereinheit;

Die Doppelmutante $S^{1151}A/S^{1154}A$ wurde auf die Wirkung des PKC-Aktivators PMA und der katalytischen Untereinheit der PKC untersucht. In Abbildung 3.12A sind die entsprechenden Strom-Spannungs-Beziehungen von *Whole-cell*-Messungen dargestellt. Die Gabe von 100 nM PMA führte zu keiner signifikanten Veränderung des BK_A -Stroms gegenüber der Kontrolle. Bei einem Potential von +80 mV betrug der Kontrollstrom in sechs Messungen 125.7 ± 3.8 pA/pF vor und 125.9 ± 3.5 pA/pF nach Gabe von PMA. In *Inside-out*-Messungen (Abbildung 3.12B) führte die Gabe von 30 nM PKC ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung gegenüber der Kontrolle. In sechs Messungen betrug die mittlere Leitfähigkeit des Kontrollstroms bei einem Potential von +80 mV 10.7 ± 2.0 nS vor und 11.1 ± 1.5 nS nach Gabe von 30 nM PKC. Das halbmaximale Aktivierungspotential ($V_{1/2}$) der Kontrolle zeigte mit 53.2 ± 2.0 mV keinen signifikanten Unterschied gegenüber nicht-mutierten BK_A -Kanälen (51.6 ± 4.6 mV, $n=7$; Werte aus Abbildung 3.8B).

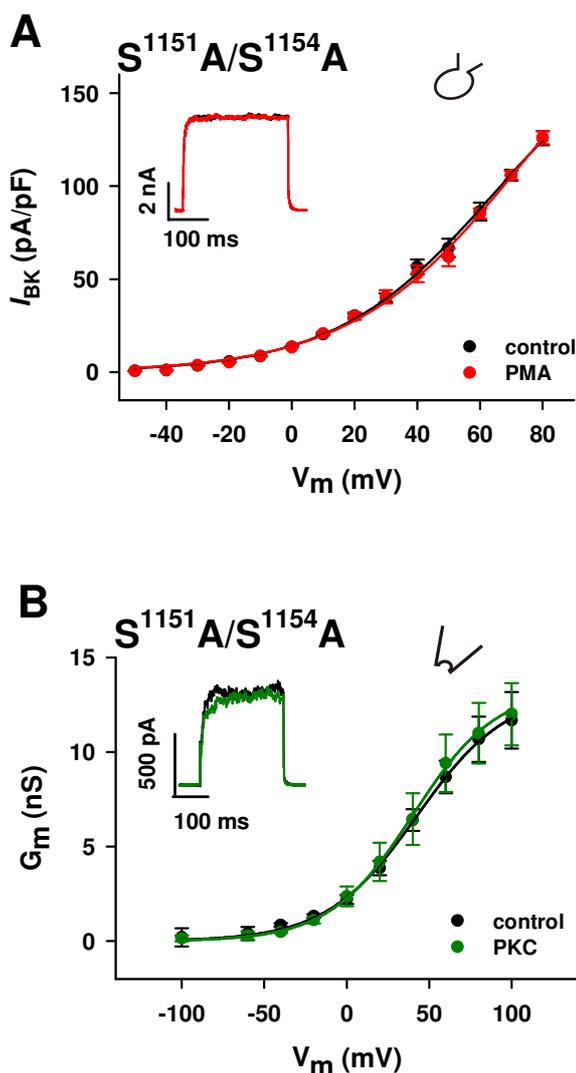


Abbildung 3.12 Fehlende Regulation der BK_A -Kanal Doppelmutante $S^{1151}A/S^{1154}A$ durch die PKC

A: *Whole-cell* Strom-Spannungskurven der Doppelmutante $S^{1151}A/S^{1154}A$. Nach Aufzeichnung des Kontrollstroms (control, schwarz) wurden die Zellen mit 100 nM PMA superfundiert (rot, $n=6$).

B: Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen von insgesamt sechs *Inside-out*-Patches. Nach Messung des Kontrollstroms (schwarz) wurde die cytosolische Seite des Patches mit 30 nM PKC überspült (grün). Originalströme bei einem Messpotential von +80 mV sind oberhalb der I/V bzw. G/V-Kurven dargestellt.

☞=*Whole-cell*-Konfiguration; ☞=*Inside-out*-Konfiguration

Die Ergebnisse der Abbildung 3.12 zeigen, dass entweder das Tandemmotiv oder eines der beiden Serine essentiell für die PKC-induzierte Hemmung des BK_A-Kanals ist. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die Phosphorylierung eines der beiden Serine (Ser¹¹⁵¹ oder Ser¹¹⁵⁴) ausreicht, um die Aktivität des Kanals durch die PKC zu hemmen. Hierfür wurden die Serine einzeln mittels zielgerichteter Mutagenese durch Alanin ausgetauscht und in der *Whole-cell*-Konfiguration auf die Wirkung von PMA untersucht. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 3.13 dargestellt. Wie aus Teil A ersichtlich, wird der BK_A-Strom der Kanalmutante S¹¹⁵⁴A durch die Gabe von 100 nM PMA gehemmt. Das Ausmaß der Hemmung entspricht einer Hemmung um 48.2 ± 2.3 % und zeigt somit keinen Unterschied gegenüber dem nicht-mutierten BK_A-Kanal (57.2 ± 3.4 %). Als Negativkontrolle wurde das inaktive PMA-Analogon 4- α -PMA appliziert. 100 nM 4- α -PMA hatte keinen Einfluss auf den BK_A-Strom (B). Im Gegensatz zur Kanalmutante S¹¹⁵⁴A zeigt Abbildung 3.13C, dass die Superfusion der Mutante S¹¹⁵¹A mit 100 nM PMA bei keinem Potential zu einer signifikanten Veränderung der Stromdichte gegenüber der Kontrolle führt. Für die PKC-induzierte Hemmung scheinen somit nicht beide Serine, sondern ausschließlich Ser¹¹⁵¹ essentiell zu sein.

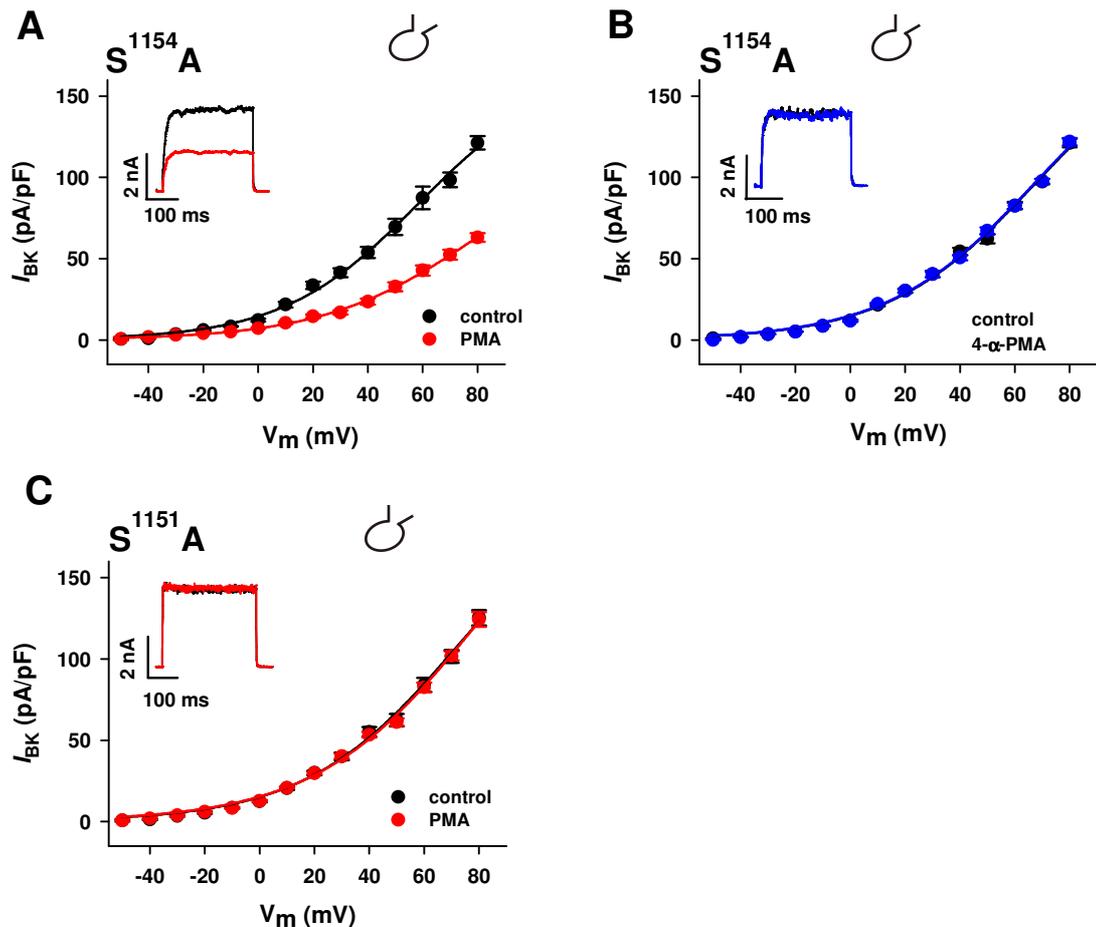


Abbildung 3.13 Ser¹¹⁵¹ ist an der Hemmung des BK_A-Kanals durch die PKC beteiligt

Whole-cell Strom-Spannungskurven der Mutanten $S^{1151}A$ und $S^{1154}A$.

Nach Aufzeichnung des Kontrollstroms (control, schwarz) wurden die Zellen mit PMA (rot) superfundiert. Als Negativkontrolle wurden Messungen mit dem inaktiven PMA-Analogon 4- α -PMA (blau) durchgeführt. Der BK_A-Strom der Mutante $S^{1154}A$ wurde in Anwesenheit von PMA gehemmt (A, $n=12$), während der Strom der Mutante $S^{1151}A$ keine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrolle zeigte (C, $n=13$). 4- α -PMA hatte keinen Effekt auf den Strom der Mutante $S^{1154}A$ (B, $n=10$). Die Originalaufnahmen zeigen repräsentative Ströme bei einem Potential von +80 mV. $[Ca^{2+}]_i$ in der Pipette betrug 1 μ M. ⌚ =Whole-cell-Konfiguration

Zur Absicherung der Ergebnisse, wurden zusätzlich Messungen unter Verwendung der katalytischen Untereinheit der PKC durchgeführt. Abbildung 3.14 zeigt die entsprechenden Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen. Die Versuche unterstreichen die Relevanz des Ser¹¹⁵¹ bei der PKC-induzierten Hemmung. Bei keinem der acht Versuche wurde eine signifikante Hemmung beobachtet. Weiterhin lässt sich aus Abbildung 3.14 ersehen, dass die Aktivierungskinetik der Mutante $S^{1151}A$ gegenüber

nicht-mutierten BK_A-Kanälen unverändert bleibt, welches an einem $V_{1/2}$ -Wert von 54.2 ± 2.0 mV zu erkennen ist.

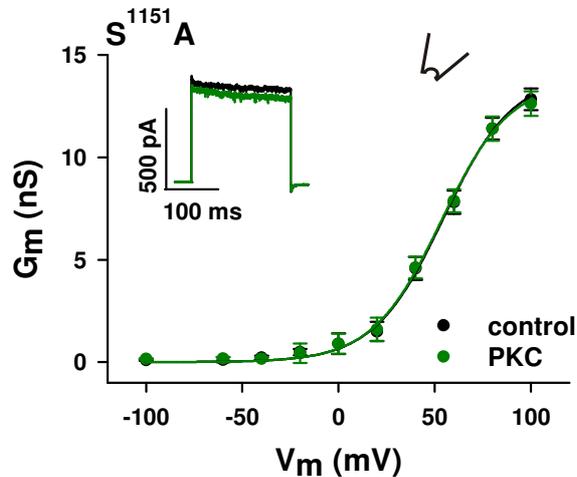


Abbildung 3.14 Verlust des PKC-induzierten Hemmeffektes durch Mutation des Ser¹¹⁵¹ in Alanin

Gezeigt sind Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen von acht Inside-out-Patches der Mutante S¹¹⁵¹A. Die PKC (30 nM) hat keine inhibitorische Wirkung auf den Kanal, wenn das Ser¹¹⁵¹ gegen Alanin ersetzt wird. Repräsentative Originalaufnahmen der Ströme sind bei einem Potential von +80 mV dargestellt. ✓=Inside-out-Konfiguration

Ein Fehlen der PKC-induzierten Hemmung wurde auch bei der natürlich vorkommenden trunkierten Isoform C (BK_C) des BK-Kanals beobachtet (vergl. Abbildung 3.11). Die ermittelten Strom-Spannungs-Kurven aus den *Whole-cell*-Messungen sind in Abbildung 3.15 gezeigt. Die Applikation von 100 nM PMA führte zu keiner signifikanten Veränderung des Stroms gegenüber der Kontrolle. Diese Versuche untermauern unsere Beobachtung, dass die Phosphorylierung des Ser¹¹⁵¹ notwendig ist, um eine Hemmung des BK_A-Kanals durch die PKC zu induzieren.

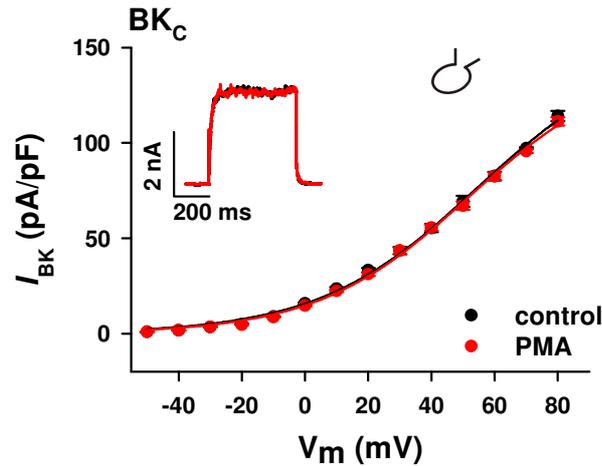


Abbildung 3.15 Fehlende Hemmung des BK_C -Kanals durch die PKC

Whole-cell Strom-Spannungs-Kurven des BK_C -Kanals vor und nach Gabe von 100 nM PMA. $[Ca^{2+}]_i$ in der Pipette betrug 1 μ M. PMA hat keine Wirkung auf die Stromdichte. Originalströme bei einem Messpotential von +80 mV sind zusätzlich oberhalb der I/V-Kurve dargestellt. Ⓞ =Whole-cell-Konfiguration

3.4 Ser¹¹⁵¹ des BK_A -Kanals liegt bereits konstitutiv phosphoryliert vor

Wenn die Phosphorylierung des Ser¹¹⁵¹ und damit die Inkorporation einer negativen Ladung an dieser Stelle entscheidend für die Hemmung des BK_A -Kanals durch die PKC ist, dann sollte der Austausch von Ser¹¹⁵¹ durch eine negativ geladene Aminosäure eine Phosphorylierung imitieren können. Wir haben deshalb das Ser¹¹⁵¹ mit Hilfe zielgerichteter Mutagenese gegen Aspartat (D) ausgetauscht (S¹¹⁵¹D). Aspartat imitiert aufgrund seiner großen anionischen Seitenkette die bei der Phosphorylierung auftretende negative Ladung des Phosphatrests. Die Kanalmutante S¹¹⁵¹D wurde in der *Inside-out*-Konfiguration auf die Wirkung der PKC (30 nM) untersucht. Zu unserer Überraschung stellten wir fest, dass die Mutante S¹¹⁵¹D sich mit einer mittleren Leitfähigkeit von 16.0 ± 0.8 nS ($n=6$, +80 mV), einem halbmaximalem Aktivierungspotential von 46.1 ± 4.1 mV und einer prozentualen Hemmung um 52.2 ± 4.1 % nach Gabe von 30 nM PKC genauso verhielt wie nicht-mutierte BK_A -Kanäle. Die entsprechenden Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen sind in Abbildung 3.16 dargestellt.

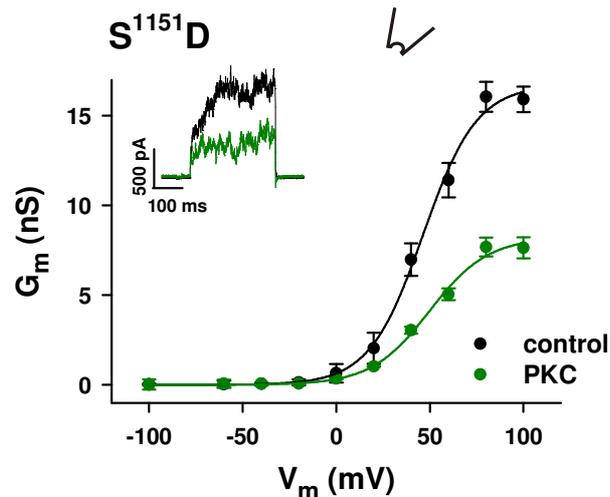


Abbildung 3.16 Aktivität der Kanalmutante $S^{1151}D$ wird durch die PKC gehemmt

Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen der Mutante $S^{1151}D$ in Anwesenheit von 30 nM PKC (grün, $n=6$); Kontrolle (control, schwarz). Die Originalaufnahmen zeigen repräsentative Ströme bei einem Potential von +80 mV. \checkmark =Inside-out-Konfiguration

Dieses Ergebnis ist überraschend, da sowohl nicht-mutierte BK_A -Kanäle als auch BK -Kanäle, die eine negative Ladung in der Position von Ser^{1151} tragen ($S^{1151}D$), durch die PKC in ihrer Aktivität gehemmt werden, während der Austausch von Ser^{1151} gegen Alanin ($S^{1151}A$) zu einem Verlust des PKC-Effektes führt. Dies zeigt, dass Ser^{1151} für die PKC-induzierte Hemmung essentiell ist, wobei es jedoch nicht alleine für die Hemmung verantwortlich zu sein scheint. In einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das PKC-Tandemmotiv die Regulation des BK -Kanals durch die PKA und PKG beeinflusst. Substitution der beiden Serine Ser^{1151} und Ser^{1154} durch Alanin induzierte einen Wechsel von der PKG- zur PKA-Regulation des Kanals. Der nicht-mutierte BK_A -Kanal wurde ausschließlich durch die PKG aktiviert, während die Mutante $S^{1151}A/S^{1154}A$, die durch die beiden Alanine einen dephosphorylierten Zustand an diesen Positionen imitiert, nur durch die PKA aktiviert wurde (Zhou et al., 2001). Um zu überprüfen, ob eine negative Ladung in der Position von Ser^{1151} zu einer Veränderung der PKG- und PKA-Regulation des Kanals führt, wurden *Inside-out*-Messungen der Mutante $S^{1151}D$ in Gegenwart von 300 nM PKG bzw. PKA durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.17 dargestellt. Die Einführung einer negativen Ladung in der Position Ser^{1151} führte zu

keinem Unterschied gegenüber nicht-mutierten BK_A-Kanälen. Die Gabe von 300 nM PKG induzierte eine Linksverschiebung des halbmaximalen Aktivierungspotentials um 26 mV (Kontrolle: 51.4 ± 4.1 mV und PKG: 25.1 ± 4.4 mV, n=6). Im Gegensatz zur PKG konnte nach Applikation von 300 nM PKA in sechs Messungen kein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle beobachtet werden.

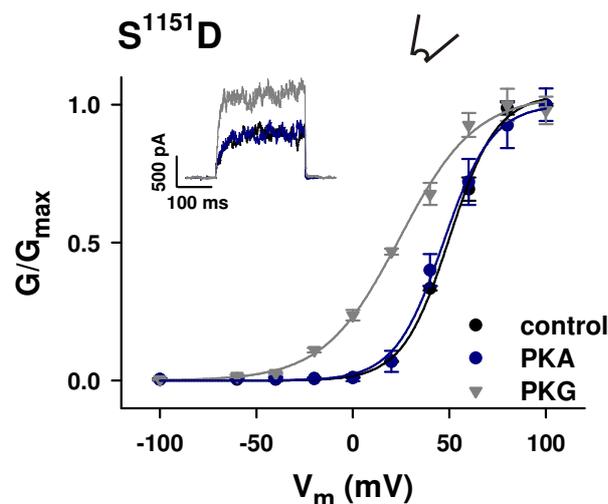


Abbildung 3.17 Regulation der Mutante $S^{1151}D$ durch die PKA und PKG

Dargestellt sind normalisierte Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen der Mutante $S^{1151}D$ in Anwesenheit von PKG (dunkelgrau, n=6) und PKA (dunkelblau, n=6). Der Kontrollstrom (control, schwarz) wurde aus beiden Messungen zusammengefasst (n=12). Zusätzlich sind repräsentative Originalströme bei einem Potential von +80 mV dargestellt. ✓=Inside-out-Konfiguration

In Abbildung 3.18A sind normalisierte Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen an nicht-mutierten BK_A-Kanälen dargestellt. Nach Aufzeichnung des Kontrollstroms folgte die Gabe von 300 nM PKA oder PKG. Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, konnte eine Aktivierung des BK_A-Kanals nur in Gegenwart der PKG hervorgerufen werden, die sich in einer Linksverschiebung der Leitfähigkeits-Spannungskurve und damit des $V_{1/2}$ um 31 mV zu negativeren Potentialen entlang der Spannungsachse äußerte. Das $V_{1/2}$ betrug in acht Messungen 55.1 ± 14.8 mV vor und 24.6 ± 1.9 mV nach der Gabe von 300 nM PKG. Nach Superfusion der cytosolischen Seite mit 300 nM PKA konnte keine signifikante Änderung der normalisierten Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung im Vergleich zur Kontrolle gemessen

werden (56.7 ± 11.9 mV). Da die Mutante $S^{1151}D$ sich in der Regulation durch die PKC, PKA und PKG genauso verhielt wie nicht-mutierte BK_A -Kanäle liegt der Schluss nahe, dass das Ser^{1151} konstitutiv phosphoryliert vorliegt. Diese Vermutung wurde bekräftigt durch die Untersuchung der Wirkung von PKA und PKG auf die Mutante $S^{1151}A$. Die Abbildung 3.18B zeigt eindeutig, dass die Mutante $S^{1151}A$, bei der eine Phosphorylierung an dieser Stelle nicht mehr möglich ist, im Gegensatz zum nicht-mutierten BK_A -Kanal und zur Mutante $S^{1151}D$ nicht mehr durch die PKG, sondern nur durch die PKA aktiviert wird. Die Gabe von 300 nM PKG führte zu keiner signifikanten Veränderung gegenüber der Kontrolle, so dass in sieben Messungen ein $V_{1/2}$ von 52.1 ± 5.1 mV (Kontrolle) vor und 50.7 ± 5.8 mV nach Applikation der PKG ermittelt wurde. Die Aktivierung der Mutante $S^{1151}A$ durch die PKA führte in sieben Messungen zu einer Linksverschiebung der Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung um 29 mV zu negativeren Potentialen, d.h. das halbmaximale Aktivierungspotential ($V_{1/2}$) von 52.1 ± 5.1 mV wurde durch die Gabe von 300 nM PKA auf 22.7 ± 4.2 mV verschoben.

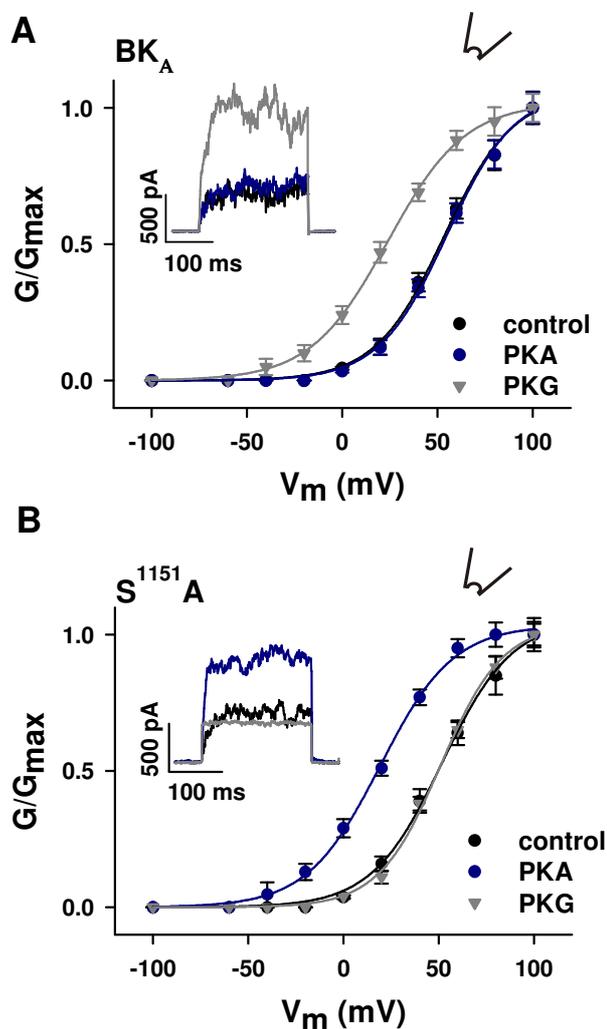


Abbildung 3.18 Regulation des nicht-mutierten BK_A -Kanals und der Mutante $S^{1151}A$ durch die PKA und PKG

In Abbildung A und B sind normalisierte Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen von Inside-out-Patches dargestellt. A: Regulation der Isoform BK_A durch die PKG (dunkelgrau, $n=8$) und die PKA (dunkelblau, $n=8$); Kontrolle (control, schwarz, $n=16$). B: Regulation der Mutante $S^{1151}A$ durch die PKG (dunkelgrau, $n=7$) und die PKA (dunkelblau, $n=7$); Kontrolle (control, schwarz, $n=14$). Kontrollmessungen wurden für die PKG- und PKA-Versuche zusammengefasst. Die Originalströme sind bei einem Potential von +80 mV dargestellt. ✓=Inside-out-Konfiguration

Auch bei der Isoform C (BK_C), der das Ser^{1151} fehlt, konnte ausschließlich eine Aktivierung durch die PKA beobachtet werden (Abbildung 3.19). Das $V_{1/2}$ betrug in acht Messungen 51.4 ± 4.4 mV vor und 23.6 ± 3.2 mV nach Applikation von PKA, d.h. $V_{1/2}$ wird um 28 mV zu negativeren Potentialen verschoben. Die Applikation von PKG dagegen führte in acht Messungen zu keiner signifikanten Veränderung gegenüber der Kontrolle.

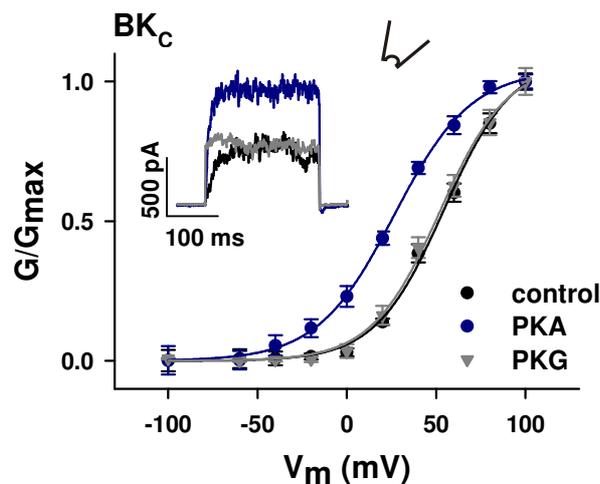


Abbildung 3.19 Regulation der Isoform C (BK_C) durch die PKA und PKG

Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen in der *Inside-out*-Konfiguration. Regulation der Isoform C (BK_C) durch die PKG (dunkelgrau, $n=8$) und die PKA (dunkelblau, $n=8$), Kontrollmessungen wurden für die PKG- und PKA-Versuche zusammengefasst (control, schwarz, $n=16$). Die Originalströme sind bei einem Potential von +80 mV oberhalb der G/V-Kurve dargestellt. ↙ = *Inside-out*-Konfiguration

Im Folgenden wurde versucht durch Dephosphorylierung von Ser^{1151} eine Aktivierung durch die PKA an nicht-mutierten BK_A -Kanälen hervorzurufen. Die Versuche wurden im *Inside-out*-Modus durchgeführt. In Abbildung 3.20 sind die mittleren Leitfähigkeiten bei einem Potential von +80 mV dargestellt. Nach Aufzeichnung des Kontrollstroms wurden nicht-mutierte BK_A -Kanäle für fünf Minuten mit dem PKC-Inhibitor-Peptid PKC_{19-31} (5 μ M) in einer ATP-freien Lösung vorbehandelt um PKC-abhängige Phosphorylierungsstellen zu dephosphorylieren. Anschließend wurde der Patch fünf Minuten lang in Anwesenheit von ATP (3 mM), dem PKC-Inhibitor PKC_{19-31} (5 μ M) und der katalytischen Untereinheit der PKA (Abbildung 3.20A) bzw. PKG (Abbildung 3.20B) überströmt. Aus Teil A der Abbildung wird ersichtlich, dass BK-Kanäle

im dephosphorylierten Zustand durch die PKA aktiviert wurden, ähnlich wie bei der Kanalmutante S¹¹⁵¹A. In acht Messungen nahm die mittlere Leitfähigkeit von 10.0 ± 0.5 nS (Kontrolle) auf 17.0 ± 0.5 nS nach der Gabe von 300 nM PKA und 5 μ M PKC₁₉₋₃₁ in einer ATP-reichen Lösung (3 mM) zu. Im Gegensatz zur PKA konnte in sieben Messungen keine Zunahme der Leitfähigkeit durch die PKG in Anwesenheit von PKC₁₉₋₃₁ und 3 mM ATP induziert werden (Abbildung 3.20B Kontrolle: 10.6 ± 0.6 nS; PKG: 10.4 ± 0.7 nS).

Ähnliche Wirkungen auf die Leitfähigkeiten wurden auch bei Verwendung von 1 μ M des PKC-Inhibitors Ro 31-8220 anstatt von PKC₁₉₋₃₁ beobachtet (Abbildung 3.20C und D).

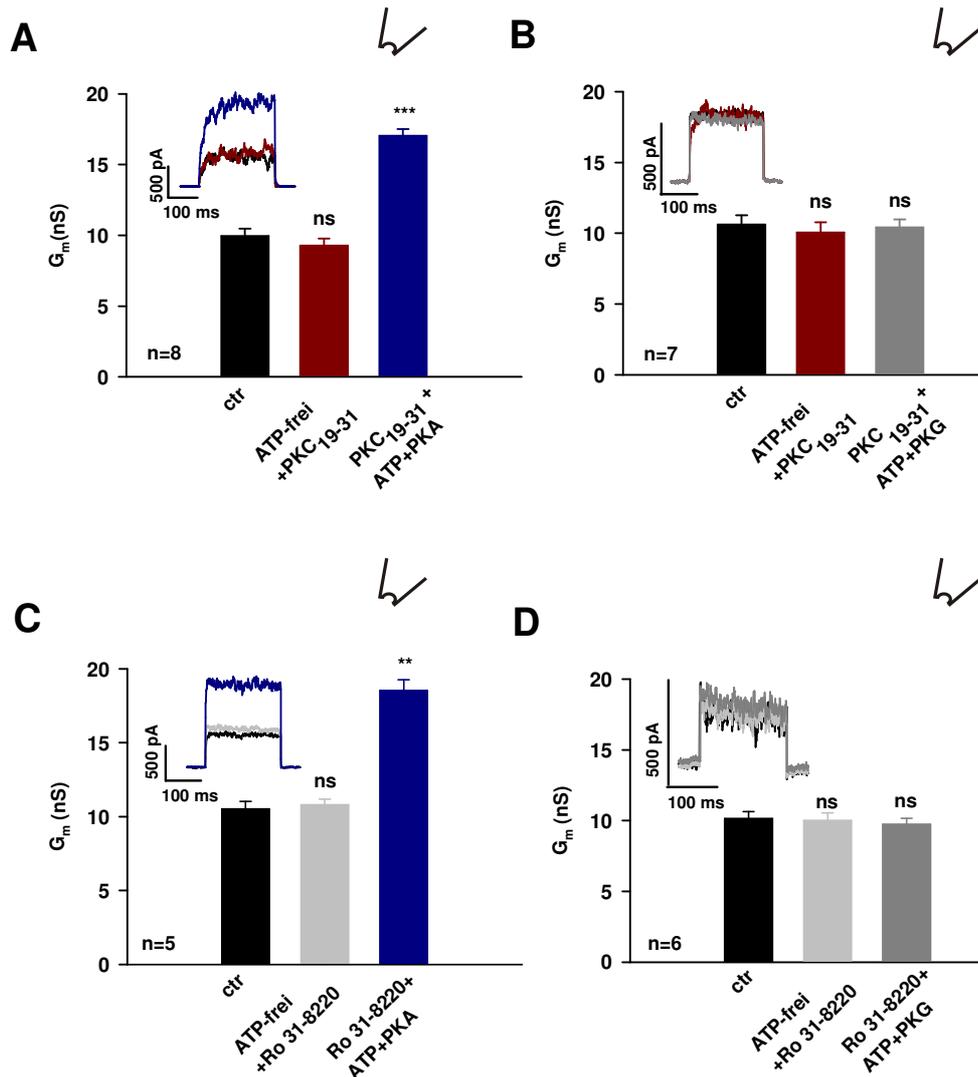


Abbildung 3.20 Inhibition der PKC führt zu einem „switch“ der BK_A-Kanal-Aktivierung von PKG zur PKA

Dargestellt sind Leitfähigkeiten des BK_A-Kanals in der Inside-out-Konfiguration bei einem Potential von +80 mV. In A und B wurde der Patch zunächst für fünf Minuten mit ATP-freier Lösung plus 5 μM PKC₁₉₋₃₁ superfundiert (braune Balken) und anschließend mit einer 3 mM ATP-haltigen Lösung plus 5 μM PKC₁₉₋₃₁ und 300 nM PKA (dunkelblau, A) oder PKG (dunkelgrau, B). In C und D wurde statt des Inhibitor-Peptids PKC₁₉₋₃₁ der PKC-Inhibitor Ro 31-8220 (grau) eingesetzt. Weiterhin sind repräsentative Originalströme bei einem Potential von +80 mV dargestellt, die den Balken farblich entsprechen. Ctr=Kontrolle, **p<0.01 verglichen gegenüber der Kontrolle (Ctr), ***p<0.001 verglichen gegenüber der Ctr, ns= nicht signifikant gegenüber der Ctr. ↙=Inside-out-Konfiguration

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in nicht-mutierten BK_A-Kanälen das Ser¹¹⁵¹ konstitutiv phosphoryliert vorliegt. Der phosphorylierte Zustand von Ser¹¹⁵¹ ist Voraussetzung für die PKC-induzierte Hemmung und gleichzeitig für die PKG-induzierte Aktivierung. Nur im dephosphorylierten Zustand des Ser¹¹⁵¹ wird der BK_A-Kanal durch die PKA aktiviert. Die Dephosphorylierung in ATP-freier Lösung erfolgt dabei vermutlich durch eine mit dem Kanal assoziierte Proteinphosphatase.

3.5 Neben Ser¹¹⁵¹ ist auch Ser⁶⁹⁵ für die PKC-abhängige Hemmung des BK_A-Kanals essentiell

Da die bisherigen Versuche gezeigt haben, dass der in HEK293-Zellen exprimierte BK_A-Kanal bereits an der Position Ser¹¹⁵¹ phosphoryliert vorliegt, muss demzufolge mindestens ein weiteres Serin-/Threoninmotiv durch die PKC phosphoryliert werden, um eine Hemmung der Kanalaktivität zu induzieren. Um dieses noch unbekanntes Serin zu identifizieren, wurden mögliche PKC-Phosphorylierungsstellen des BK_A-Kanals ermittelt (Kennelly and Krebs, 1991). Es konnten neben Ser¹¹⁵¹ und Ser¹¹⁵⁴ sieben weitere Serine identifiziert werden: Ser³⁹³, Ser⁴⁹⁹, Ser⁶²⁵, Ser⁶³⁰, Ser⁶⁹⁵, Ser⁷¹² und Ser¹¹²⁹. In Abbildung 3.21 sind die Positionen der putativen Phosphorylierungsstellen der PKC in das Topologie-Modell der α -Untereinheit des BK_A-Kanals eingezeichnet.

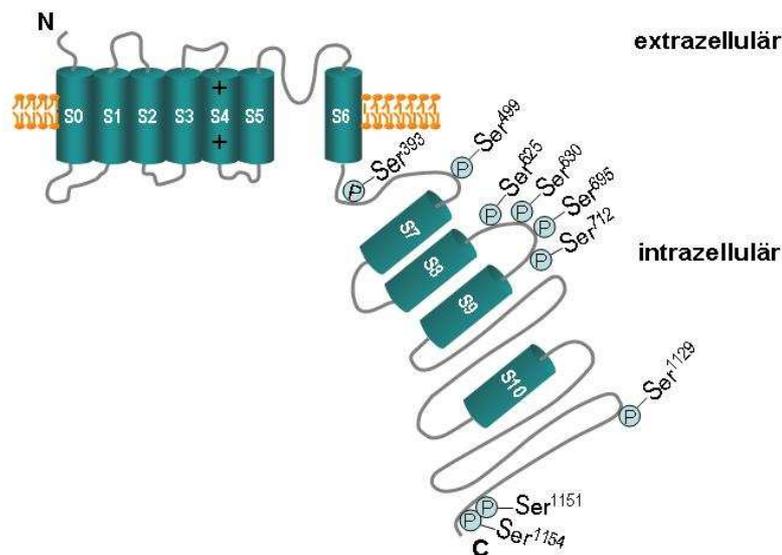


Abbildung 3.21 Topologie-Modell der α -Untereinheit des BK_A -Kanals

Dargestellt ist die α -Untereinheit des BK_A -Kanals, die aus 7 transmembranär und vier intrazellulär gelegenen Domänen besteht. Zusätzlich sind die C-terminal gelegenen putativen Phosphorylierungsstellen der PKC dargestellt.

Über gezielte Mutagenese wurden die entsprechenden Serine durch Alanin ersetzt und in HEK293-Zellen exprimiert. Neben den beiden Serinen Ser¹¹⁵¹ und Ser¹¹⁵⁴ wurde ein weiteres PKC-Tandemmotiv identifiziert (Ser⁶²⁵ und Ser⁶³⁰). Diese beiden Serine wurden sowohl einzeln als auch zusammen durch Alanin ersetzt. Die elektrophysiologische Untersuchung erfolgte in der *Whole-cell*-Konfiguration, wobei die Kanalmutanten auf die Wirkung von PMA und dessen inaktives Analogon 4- α -PMA untersucht wurden. Alle Mutanten mit Ausnahme von S⁶⁹⁵A zeigten typische Ströme, die sich in der Größe und in der prozentualen Abnahme nach Applikation von PMA nicht wesentlich von nicht-mutierten BK_A -Kanälen unterscheiden.

In Tabelle 3.1 sind die ermittelten Stromdichten der Kanalmutanten bei einem Potential von +80 mV aufgeführt deren Aktivität durch PMA gehemmt wurde. Die ermittelten Stromdichten vor und nach Gabe des inaktiven PMA-Analogons sind zusätzlich in Tabelle 3.2 dargestellt. Die Kanalmutante S⁶³⁰A wurde nicht näher untersucht, da bereits die Aktivität der Doppelmutante

$S^{625}A/S^{630}A$ in Gegenwart von PMA gehemmt wurde. Die entsprechenden Strom-Spannungs-Kurven sind im Anhang dargestellt.

Mutante	n	Kontrolle (pA/pF)	PMA (pA/pF)
$S^{393}A$	11	122.3 ± 1.0	62.8 ± 1.3
$S^{499}A$	11	127.7 ± 1.1	63.2 ± 1.7
$S^{625}A$	11	121.2 ± 8.0	63.0 ± 4.5
$S^{625}A/S^{630}A$	12	123.0 ± 0.6	63.5 ± 2.0
$S^{712}A$	9	120.0 ± 0.5	62.1 ± 1.9
$S^{1129}A$	14	120.7 ± 1.2	64.4 ± 2.2

Tabelle 3.1 Mittelwerte und Standardfehler (SE) der aus n Messungen bei einem Potential von +80 mV ermittelten Stromdichten vor (Kontrolle) und nach Gabe von PMA.

Mutante	n	Kontrolle (pA/pF)	4- α -PMA (pA/pF)
$S^{393}A$	6	121.0 ± 1.6	119.9 ± 0.4
$S^{499}A$	6	122.3 ± 1.5	121.3 ± 1.3
$S^{625}A$	7	123.0 ± 4.2	121.1 ± 7.5
$S^{625}A/S^{630}A$	6	118.6 ± 0.8	118.7 ± 0.8
$S^{712}A$	6	120.1 ± 1.3	119.9 ± 1.3
$S^{1129}A$	6	118.8 ± 2.2	120.1 ± 1.0

Tabelle 3.2 Mittelwerte und Standardfehler (SE) der aus n Messungen bei einem Potential von +80 mV ermittelten Stromdichten vor (Kontrolle) und nach Gabe von 4- α -PMA.

Die Aktivität der Kanalmutante $S^{695}A$ zeigte keine signifikante Veränderung nach Applikation von 100 nM PMA. Die entsprechenden Strom-Spannungs-Kurven sind in Abbildung 3.22 dargestellt. In 14 Messungen betrug die Stromdichte bei einem Potential von +80 mV 121.8 ± 1.8 pA/pF vor und 121.9 ± 2.3 pA/pF nach Gabe von 100 nM PMA (A). Zur Absicherung des Befundes wurden zusätzlich Versuche in der *Inside-out*-Konfiguration durchgeführt. Dazu wurde die cytosolische

Seite des Patches mit 30 nM PKC superfundiert. In Abbildung 3.22B sind die entsprechenden Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen dargestellt, die deutlich zeigen, dass die Leitfähigkeit in Anwesenheit von PKC keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle aufweist. Bei einem Potential von +80 mV betrug die mittlere Leitfähigkeit in acht Messungen 11.6 ± 0.6 nS vor und 11.5 ± 0.6 nS nach der Gabe von PKC. Das $V_{1/2}$ der Kontrolle lag bei 54.0 ± 2.1 mV und zeigte somit keine signifikante Änderung gegenüber nicht-mutierten BK_A-Kanälen (51.6 ± 4.6 mV).

Zur besseren Übersicht ist in Abbildung 3.23 die Hemmung der Stromdichte aller Mutanten durch Superfusion mit PMA in Prozent der Kontrolle bei einem Messpotential von +80 mV dargestellt. Dabei wurde bei allen Mutanten mit Ausnahme von S⁶⁹⁵A und S¹¹⁵¹A eine Hemmung um ca. 50 % beobachtet. Für die PKC-induzierte Hemmung des BK-Kanals scheinen nur Ser⁶⁹⁵ und Ser¹¹⁵¹ essentiell zu sein.

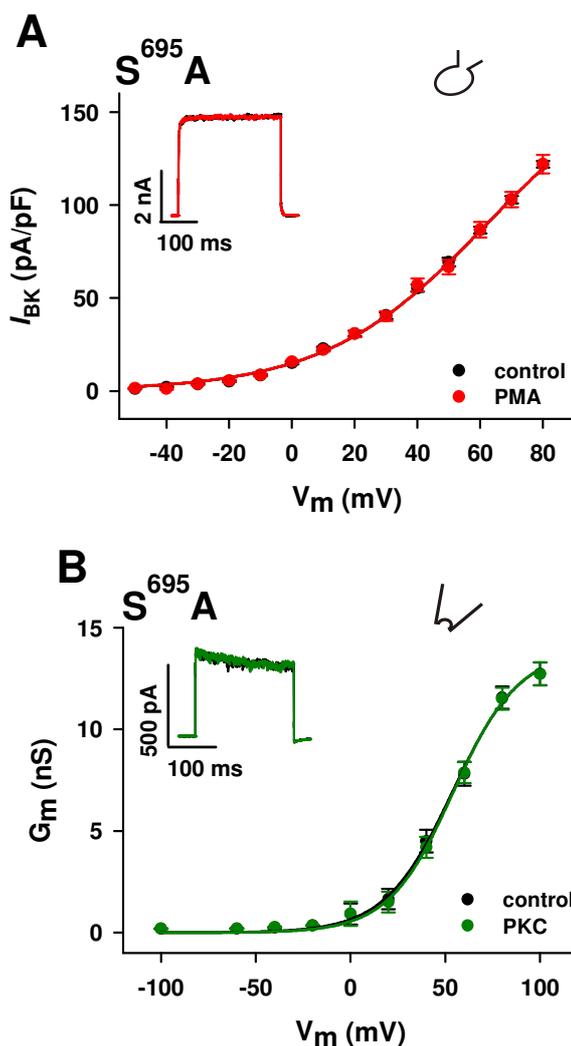


Abbildung 3.22 Die Mutation des Ser⁶⁹⁵ in Alanin führt zum Verlust der PKC-induzierten Hemmung

A: 14 Whole-cell Patch-Clamp-Messungen der Mutante S⁶⁹⁵A vor und nach Applikation von 100 nM PMA. Aufgetragen ist die Spannung (mV) gegen die Stromdichte (pA/pF).

B: Acht Inside-out Patch-Clamp-Messungen der Mutante S⁶⁹⁵A vor und nach Applikation von 30 nM PKC. Originalströme bei einem Messpotential von +80 mV sind oberhalb der I/V bzw. G/V-Kurven dargestellt.

↻=Whole-cell-Konfiguration;
↵=Inside-out-Konfiguration

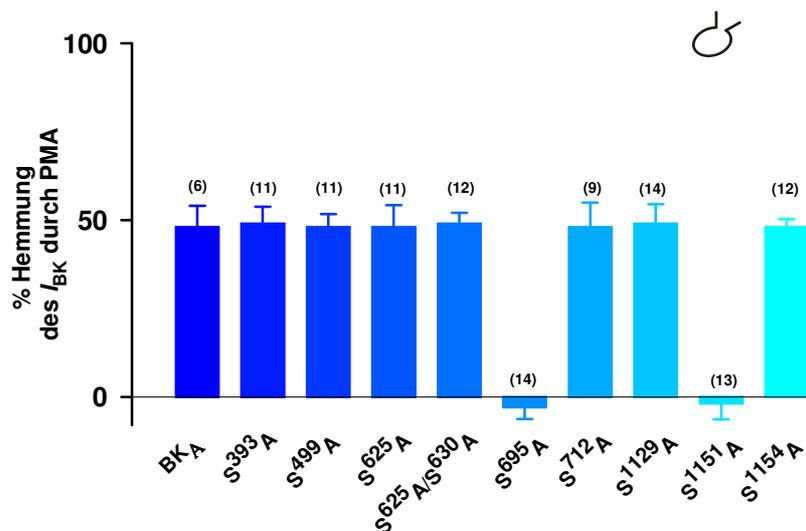


Abbildung 3.23 Prozentuale Hemmung des nicht-mutierten BK_A-Kanals und der PKC-Mutanten nach Applikation von PMA

Dargestellt ist die prozentuale Hemmung des nicht-mutierten BK_A-Kanals und der PKC-Mutanten S³⁹³A, S⁴⁹⁹A, S⁶²⁵A, S⁶²⁵A/S⁶³⁰A, S⁶⁹⁵A, S⁷¹²A, S¹¹²⁹A, S¹¹⁵¹A und S¹¹⁵⁴A nach Superfusion mit PMA. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE der gemessenen Stromdichten. Angaben über den Balken geben die Anzahl (n) der Messungen an. Ⓞ = Whole-cell-Konfiguration

3.6 Die Phosphorylierung von Ser⁶⁹⁵ durch die PKC ist abhängig von der Phosphorylierung von Ser¹¹⁵¹

Im Folgenden wurde Ser⁶⁹⁵ über gezielte Mutagenese durch Aspartat (D) ersetzt, um einen phosphorylierten Zustand des Kanals an dieser Position zu imitieren. Die Kanalmutante S⁶⁹⁵D wurde in HEK293-Zellen exprimiert und in der *Inside-out*-Konfiguration auf die Wirkung der PKC untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.24 dargestellt. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass die maximale Leitfähigkeit der Kanalmutante S⁶⁹⁵D unter Kontrollbedingungen geringer ist als in nicht-mutierten BK_A-Kanälen. Bei +80 mV entspricht dies einer signifikanten Erniedrigung um 53.2 ± 5.1 %. Dies bedeutet, dass das Einführen einer negativen Ladung an dieser Position zu einer erniedrigten Leitfähigkeit führt, die der Leitfähigkeit von nicht-mutierten BK_A-Kanälen in Anwesenheit der PKC ähnelt (vergl. Abbildung 3.8A). Das $V_{1/2}$ der Kontrolle zeigt dabei keinen Unterschied gegenüber nicht-mutierten BK_A-Kanälen (46.9 ± 4.4 mV). Die Abbildung 3.24 zeigt weiterhin, dass die PKC keine signifikante Veränderung der Leitfähigkeit

verursacht, die in sechs Messungen bei einem Potential von +80 mV 6.4 ± 0.4 nS vor und 6.9 ± 0.3 nS nach Applikation von 30 nM PKC betrug.

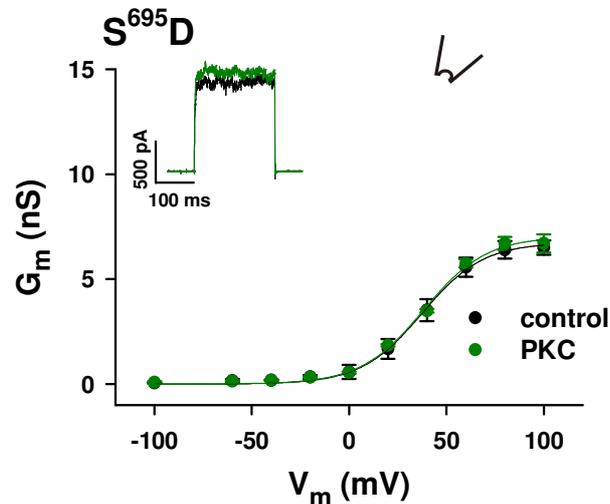


Abbildung 3.24 Untersuchung der Mutante $S^{695}D$ auf die Wirkung von PKC

Die Mutation des Ser^{695} in Aspartat wurde in der Inside-out-Konfiguration auf die Wirkung der PKC (30 nM) untersucht. Dargestellt sind Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen von sechs Messungen vor (control, schwarz) und nach Applikation von PKC (grün). Repräsentative Originalströme sind bei einem Potential von +80 mV dargestellt. ✓=Inside-out-Konfiguration

Eine reduzierte Leitfähigkeit unter Kontrollbedingungen gegenüber nicht-mutierten BK_A -Kanälen wurde auch beobachtet, wenn neben dem Ser^{695} zusätzlich das Ser^{1151} gegen Aspartat ausgetauscht wurde ($S^{695}D/S^{1151}D$). Bei dieser Mutante betrug in acht Messungen die mittlere Leitfähigkeit 6.5 ± 0.8 nS vor und 5.9 ± 1.1 nS nach Applikation von 30 nM PKC (bei +80 mV). Abbildung 3.25 zeigt die entsprechende Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung.

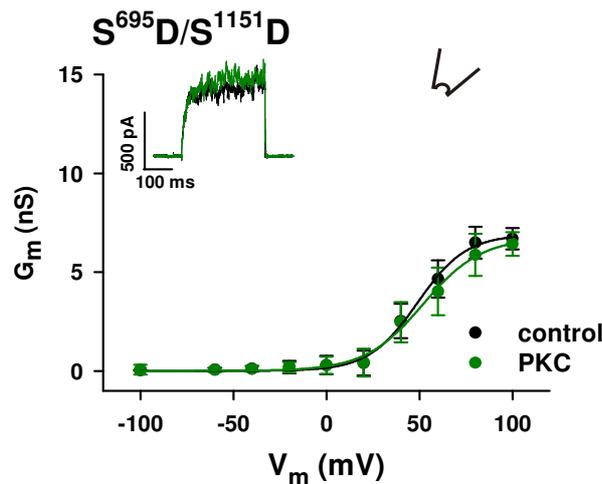


Abbildung 3.25 Regulation der Mutante $S^{695}D/S^{1151}D$ durch die PKC

Acht *Inside-out*-Messungen der Mutante $S^{695}D/S^{1151}D$ vor (control, schwarz) und nach Gabe von 30 nM PKC (grün). Die Originalaufnahmen oberhalb der *I/V*-Kurve zeigen BK_A -Ströme bei einem Messpotential von +80 mV. L✓ = *Inside-out*-Konfiguration

Um herauszufinden, ob die Phosphorylierung von Ser¹¹⁵¹ direkt an der PKC-induzierten Hemmung des BK_A -Kanals beteiligt ist, wurde eine Doppelmutante hergestellt, bei der das Ser⁶⁹⁵ gegen Aspartat und Ser¹¹⁵¹ gegen Alanin ausgetauscht wurde. Wie aus Abbildung 3.26 ersichtlich, zeigte die Aktivität der Doppelmutante $S^{695}D/S^{1151}A$ in der *Inside-out*-Konfiguration sowohl unter Kontrollbedingungen als auch in Gegenwart von 30 nM PKC keinen signifikanten Unterschied gegenüber den Mutanten $S^{695}D$ und $S^{695}D/S^{1151}D$. In acht Messungen betrug die mittlere Leitfähigkeit bei einem Potential von +80 mV 5.4 ± 0.8 nS vor (Kontrolle) und 5.6 ± 0.5 nS nach Applikation von 30 nM PKC. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine negative Ladung in der Position von Ser⁶⁹⁵ ausreicht, um den BK_A -Kanal zu hemmen. Eine PKC-abhängige Phosphorylierung an dieser Stelle ist jedoch nur möglich, wenn gleichzeitig Ser¹¹⁵¹ phosphoryliert vorliegt.

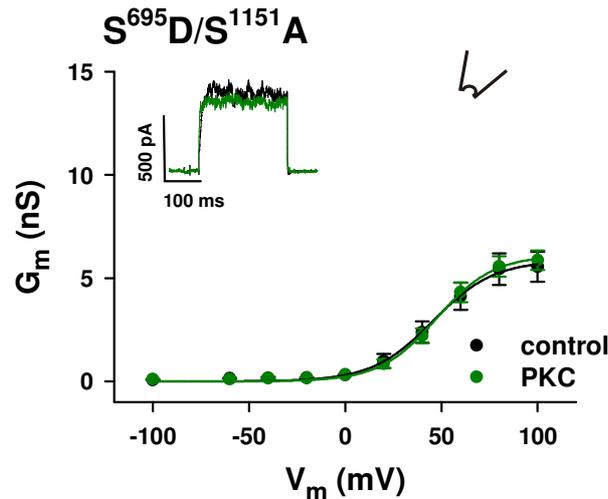


Abbildung 3.26 Wirkung von PKC auf die Mutante $S^{695}D/S^{1151}A$

Dargestellt sind Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen von acht Messungen vor (control, schwarz) und nach Gabe von 30 nM PKC (grün). Die Originalaufnahmen zeigen repräsentative Ströme bei einem Potential von +80 mV. \swarrow =Inside-out-Konfiguration

3.7 Die PKG- und PKA-induzierte Aktivierung des BK_A -Kanals wird in Gegenwart der PKC aufgehoben

In den folgenden Versuchen wurde überprüft, ob der BK_A -Kanal durch die PKG bzw. PKA aktiviert werden kann, wenn sowohl Ser^{695} als auch Ser^{1151} phosphoryliert vorliegen, d.h. die Aktivität des Kanals bereits partiell durch die PKC gehemmt wurde. Zu diesem Zweck wurden in HEK293-Zellen exprimierte nicht-mutierte BK_A -Kanäle in der *Inside-out*-Konfiguration mit 30 nM PKC vorbehandelt und anschließend mit 300 nM PKG bzw. PKA superfundiert. In Abbildung 3.27 sind die entsprechenden Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen dargestellt. Aus Teil A wird ersichtlich, dass die Applikation der PKC wie erwartet zu einer Abnahme der Leitfähigkeit führte. Nach Superfusion des Patches mit 300 nM PKG konnte keine signifikante Veränderung der Leitfähigkeit beobachtet werden, die bei einem Potential von +80 mV 6.3 ± 0.3 nS betrug. In gleicher Größenordnung lagen die Ergebnisse nach Applikation von PKA (Abbildung 3.27B). Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass die PKC-induzierte Hemmung des BK_A -Kanals weder durch die PKG noch durch die PKA aufgehoben werden kann.

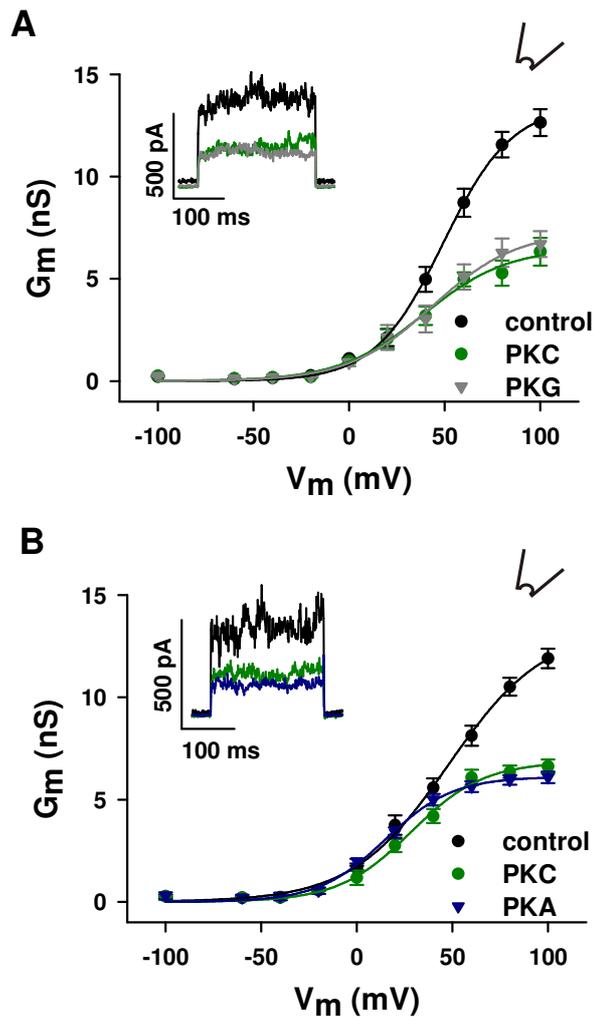


Abbildung 3.27 Regulation des BK_A -Kanals durch PKG und PKA nach Präinkubation mit PKC

Inside-out Patches von (A) acht und (B) sechs Messungen. Die cytosolische Seite des Patches wurde zunächst mit PKC (grün) superfundiert. Anschließend folgte die Gabe von 300 nM PKG (dunkelgrau, A) bzw. 300 nM PKA (dunkelblau, B). Dargestellt sind Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen mit repräsentativen Originalströmen bei einem Potential von +80 mV. ✓ = Inside-out-Konfiguration

In dem folgenden Versuch wurde untersucht, ob die Phosphorylierung des Ser⁶⁹⁵ für die Aufhebung der PKG- und PKA-abhängigen Aktivierung verantwortlich ist. Dazu wurden die Kanalmutanten S⁶⁹⁵D, S⁶⁹⁵D/S¹¹⁵¹D und S⁶⁹⁵D/S¹¹⁵¹A im *Inside-out*-Modus auf die Wirkung von PKG und PKA untersucht.

Alle drei Mutanten zeigten unter Kontrollbedingungen eine reduzierte Leitfähigkeit gegenüber dem nicht-mutierten BK_A -Kanal. Diese reduzierte Leitfähigkeit wurde weder durch die Applikation von 300 nM PKG noch durch die PKA (300 nM) signifikant verändert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.28 dargestellt. Die mittlere Leitfähigkeit unter Kontrollbedingungen der Mutanten S⁶⁹⁵D, S⁶⁹⁵D/S¹¹⁵¹D und S⁶⁹⁵D/S¹¹⁵¹A betragen bei einem Potential von +80 mV 6.9 ± 0.3 nS (n=6), 6.3 ± 0.7 nS (n=8) und 6.4 ± 0.6 nS (n=8). Durch die Gabe von 300 nM PKG wurden sie nicht signifikant verändert und

betragen 7.4 ± 0.3 nS, 6.8 ± 0.5 nS und 6.8 ± 1.0 nS. Die Gabe von 300 nM PKA führte ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung gegenüber der Kontrolle. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Regulation des BK_A-Kanals durch die PKG oder PKA nicht mehr möglich ist, wenn sich das Ser⁶⁹⁵ im phosphorylierten Zustand befindet (PKC) oder eine negative Ladung trägt.

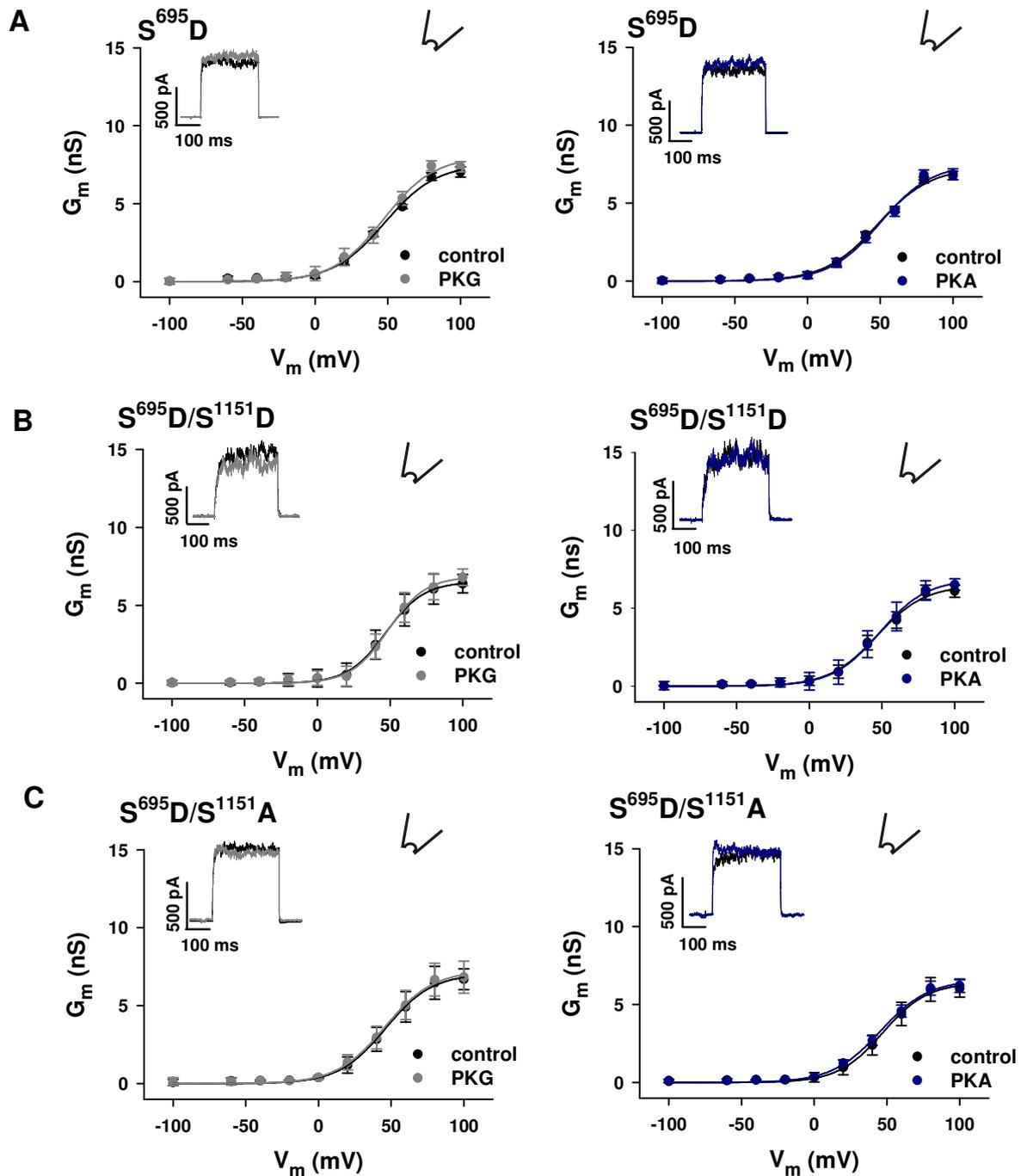


Abbildung 3.28 Wirkung von PKG und PKA auf die Mutanten $S^{695}D$, $S^{695}D/S^{1151}D$ und $S^{695}D/S^{1151}A$ in Anwesenheit von PKC

Dargestellt sind Inside-out Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen der Mutanten $S^{695}D$, $S^{695}D/S^{1151}D$ und $S^{695}D/S^{1151}A$ vor (control, schwarz) und nach Applikation von 300 nM PKG (dunkelgrau) oder PKA (dunkelblau). Die reduzierte Leitfähigkeit wurde durch die Gabe von PKG oder PKA nicht verändert.

A: Mutante $S^{695}D$ PKG (n=6); PKA (n=6)

B: Mutante $S^{695}D/S^{1151}D$ PKG (n=8); PKA (n=8)

C: Mutante $S^{695}D/S^{1151}A$ PKG (n=8); PKA (n=8)

Repräsentative Originalströme sind bei einem Potential von +80 mV dargestellt.

✓=Inside-out-Konfiguration

Zusammenfassend lässt sich aus den bisherigen Ergebnissen folgendes schließen:

- 1) Die PKC hemmt die Aktivität des BK_A-Kanals. Für die Hemmung ist die Phosphorylierung von zwei Serinen verantwortlich, Ser¹¹⁵¹ und Ser⁶⁹⁵, wobei das Ser¹¹⁵¹ im Gegensatz zum Ser⁶⁹⁵ konstitutiv phosphoryliert vorliegt. Die Phosphorylierung von Ser⁶⁹⁵ durch die PKC ist konditional, d.h. abhängig von der Phosphorylierung von Ser¹¹⁵¹. Die Versuche mit der Mutante S⁶⁹⁵D/S¹¹⁵¹A zeigen, dass eine negative Ladung an der Position von Ser⁶⁹⁵ letztlich für die PKC-induzierte Hemmung des Kanals verantwortlich ist. Gleichzeitig führt die Phosphorylierung von Ser¹¹⁵¹ dazu, dass der BK_A-Kanal nur durch die PKG aktiviert wird, während eine Dephosphorylierung von Ser¹¹⁵¹ ausschließlich eine PKA-abhängige Aktivierung erlaubt.
- 2) Phosphorylierung von Ser⁶⁹⁵ durch die PKC oder die Einführung einer negativen Ladung an dieser Position verändert den BK_A-Kanal derart, dass sowohl die PKA als auch die PKG ihre aktivierenden Eigenschaften verlieren.

3.8 Untersuchungen zur Stöchiometrie der BK-Kanal-Phosphorylierung durch die PKC

Um die Stöchiometrie der Phosphorylierung des BK-Kanals durch die PKC zu untersuchen, wurden elektrophysiologische Untersuchungen an BK_A-Kanälen durchgeführt, die innerhalb der Porenregion mutiert waren. Diese Porenmutanten weisen im *Inside-out*-Patch bei verschiedenen Potentialen die gleichen Einzelkanal-Stromamplituden auf wie nicht-mutierte BK_A-Kanäle (Tian et al., 2004). In Gegenwart von 2 mM Tetraethylammonium (TEA) in der Pipettenlösung jedoch, werden nicht-mutierte BK_A-Kanäle vollständig gehemmt, während der Strom der Porenmutante unverändert bleibt (Shen et al., 1994, Niu and Magleby, 2002, Tian et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe gezielter Mutagenese die TEA-Sensitivität aufgehoben, indem das Tyr³⁴⁷ gegen Valin ersetzt wurde (die in der Literatur von Tian et al. (2004) beschriebene Y³³⁴V-Porenmutante entspricht der Y³⁴⁷V-Mutante in dem BK_A-Klon der vorliegenden Arbeit). Abbildung 3.29 zeigt Topologie-Modelle des nicht-mutierten BK_A-Kanals, der Mutanten Y³⁴⁷V, S⁶⁹⁵A und S¹¹⁵¹A mit den entsprechenden Positionen der Phosphorylierungsstellen der PKC und der Position der TEA-Sensitivität.

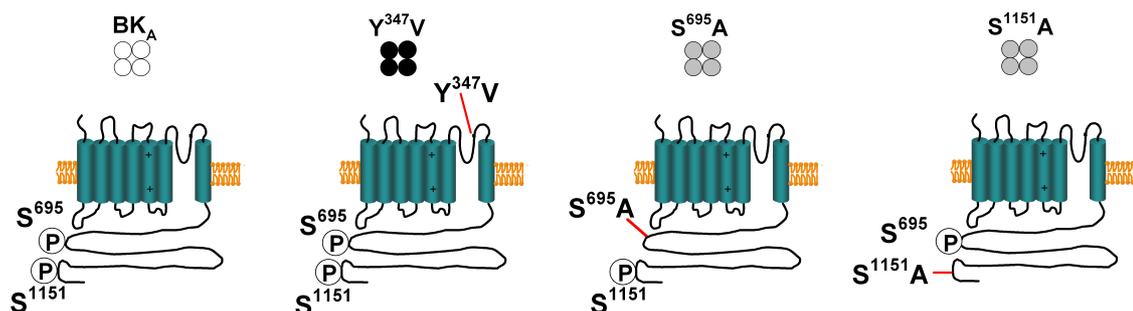


Abbildung 3.29 Topologie-Modell des nicht-mutierten BK_A-Kanals und der Mutanten Y³⁴⁷V, S⁶⁹⁵A und S¹¹⁵¹A

Dargestellt sind die entsprechenden Positionen der Phosphorylierungsstellen (P) der PKC und die Position der TEA-Sensitivität (Y³⁴⁷V). weiße Kreise: BK_A-Kanal α-Untereinheiten; schwarze Kreise: Porenmutanten α-Untereinheiten; graue Kreise: α-Untereinheiten der PKC-resistenten Mutante S⁶⁹⁵A bzw. S¹¹⁵¹A

Durch Koexpression von α -Untereinheiten des nicht-mutierten BK_A -Kanals und α -Untereinheiten der Porenmutante ($Y^{347}V$) in HEK293-Zellen, wurden im *Outside-out*-Modus je nach zufälliger Zusammensetzung des tetrameren Kanalproteins in Anwesenheit von TEA charakteristische Stromamplituden ermittelt. In Abbildung 3.30 sind die ermittelten Stromamplituden der fünf möglichen Zusammensetzungen bei +40 mV dargestellt. Die Stromamplitude erhöhte sich linear mit Zunahme der Porenmutantenuntereinheiten, und erreichte ein Maximum von 9.7 ± 0.2 mV bei einer homotetrameren Struktur bestehend aus $Y^{347}V$ -Untereinheiten. In Abbildung 3.30B sind zusätzlich charakteristische Originalregistrierungen von Einzelkanalöffnungen bei den fünf möglichen Kombinationen dargestellt.

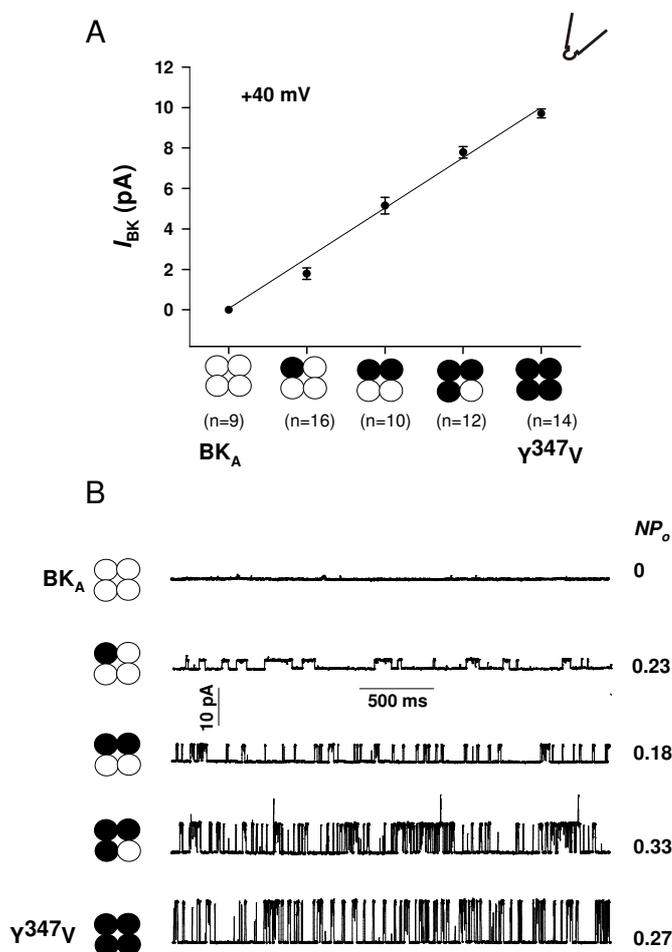


Abbildung 3.30
Einzelkanalmessungen von koexprimierten Porenmutanten- und nicht-mutierten BK_A -Kanaluntereinheiten

In A sind Stromamplituden bei einem Membranpotential von +40 mV der fünf möglichen Kombinationen des tetrameren Kanalroteins bei Koexpression von α -Untereinheiten des BK_A -Kanals und der Porenmutante in HEK293-Zellen in Anwesenheit von 2 mM TEA in der Pipettenlösung dargestellt. n = Anzahl der Messungen. B: Gezeigt sind außerdem Ausschnitte aus Einzelkanalöffnungen bei +40 mV. BK_A : nicht-mutierter BK_A -Kanal; $Y^{347}V$: Porenmutante; weiße Kreise: nicht-mutierte BK_A -Kanal α -Untereinheiten; schwarze Kreise: α -Untereinheiten der Porenmutante
 ✓ = *Outside-out*-Konfiguration

Ausgehend von den in Abbildung 3.30 gezeigten Ergebnissen wurden auf gleiche Weise α -Untereinheiten der Porenmutante mit α -Untereinheiten der PKC-resistenten Kanalmutante S⁶⁹⁵A bzw. S¹¹⁵¹A in Gegenwart von 2 mM TEA in HEK293-Zellen koexprimiert. Da die Mutanten S⁶⁹⁵A und S¹¹⁵¹A wie nicht-mutierte BK_A-Kanäle sensitiv gegenüber TEA sind, wurden auch hier die charakteristischen Stromamplituden ermittelt (nicht dargestellt). Mit Hilfe dieser Stromamplituden und aufgrund der Tatsache, dass die für die PKC-Phosphorylierung verantwortlichen Serine bei der Porenmutante noch erhalten sind, konnte durch anschließende Superfusion von *Inside-out*-Patches mit 30 nM PKC festgestellt werden, wie viele Untereinheiten durch die PKC phosphoryliert werden, um den Kanal zu hemmen. Wurden α -Untereinheiten der Porenmutante und α -Untereinheiten der Mutante S⁶⁹⁵A in HEK293-Zellen koexprimiert, konnte durch Gabe von PKC sowohl bei homotetrameren Kanälen der Porenmutante als auch bei allen möglichen Kombinationen von heterotetrameren Kanälen eine Hemmung von NP_o um 60 % beobachtet werden. Dies bedeutet, dass bereits die PKC-Phosphorylierung einer einzelnen α -Untereinheit des homotetrameren BK_A-Kanals ausreicht, um dessen Aktivität zu hemmen. Die ermittelte PKC-induzierte prozentuale NP_o -Hemmung der homotetrameren Porenmutante und der möglichen Kombinationen aus Porenmutante und PKC-resistenter Mutante S⁶⁹⁵A (Y³⁴⁷V/PKC-resistente Mutante S⁶⁹⁵A: 1:3; 2:2; 3:1) ist in Abbildung 3.31A dargestellt. Zusätzlich ist in Abbildung 3.31A die PKC-induzierte NP_o -Hemmung des homotetrameren nicht-mutierten BK_A-Kanals (BK_A) und die fehlende PKC-Hemmung der homotetrameren Mutante S⁶⁹⁵A in Abwesenheit von TEA dargestellt. Des Weiteren zeigt die Abbildung 3.31B repräsentative Einzelkanalströme von dem heterotetrameren Kanal bestehend aus einer Y³⁴⁷V- und drei S⁶⁹⁵A-Untereinheiten (in Anwesenheit von TEA) und von den homotetrameren Mutanten Y³⁴⁷V und S⁶⁹⁵A (in Abwesenheit von TEA) vor und nach Gabe der PKC.

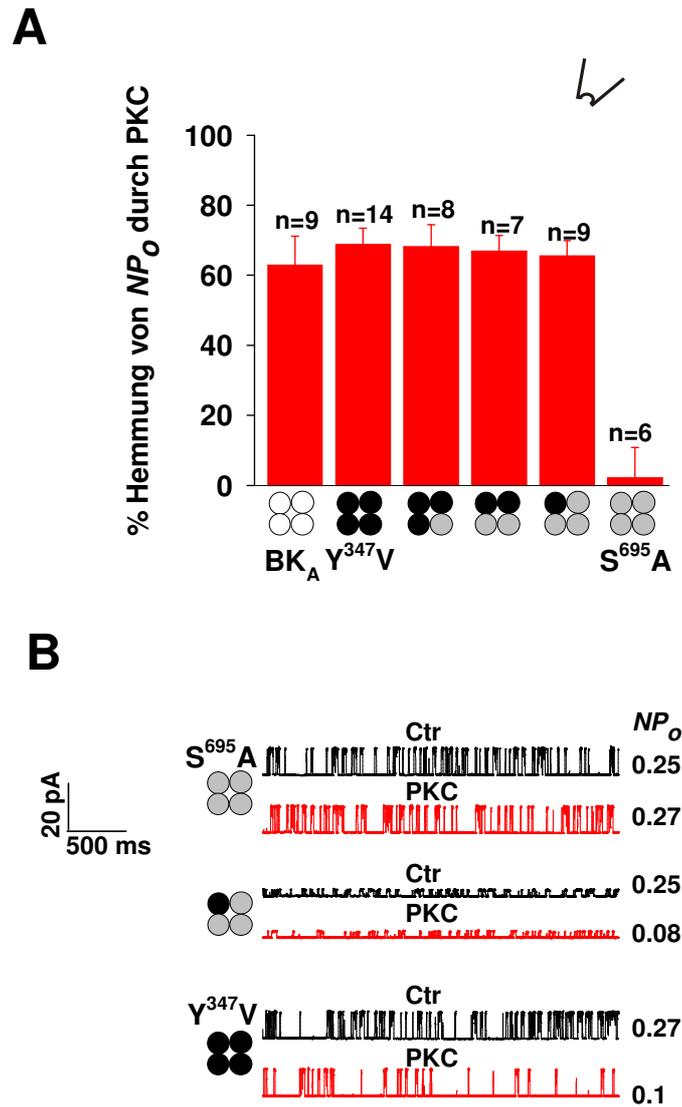


Abbildung 3.31 Die Phosphorylierung einer α -Untereinheit ist für die PKC-induzierte Hemmung ausreichend.

A: Gezeigt ist die PKC-induzierte prozentuale NP_o -Hemmung der möglichen Kombinationen des tetrameren BK_A -Kanals bei Koexpression der PKC-resistenten Mutante $S^{695}A$ und der Porenmutante $Y^{347}V$. Zusätzlich ist die PKC-induzierte Hemmung von NP_o des homotetrameren nicht-mutierten BK_A -Kanals (BK_A) und die fehlende PKC-Hemmung der homotetrameren Mutante $S^{695}A$ in Abwesenheit von TEA dargestellt. B: Dargestellt sind repräsentative Einzelkanalmessungen vor (control, schwarz) und nach Gabe von PKC (rot). Weiße Kreise: BK_A -Kanal α -Untereinheiten; schwarze Kreise: Porenmutanten α -Untereinheiten; graue Kreise: α -Untereinheiten der PKC-resistenten Mutante $S^{695}A$; ✓ = Inside-out-Konfiguration

In Versuchen bei denen statt der Mutante $S^{695}A$ die Mutante $S^{1151}A$ verwendet wurde, konnten identische Ergebnisse ermittelt werden (Abbildung 3.32A und B).

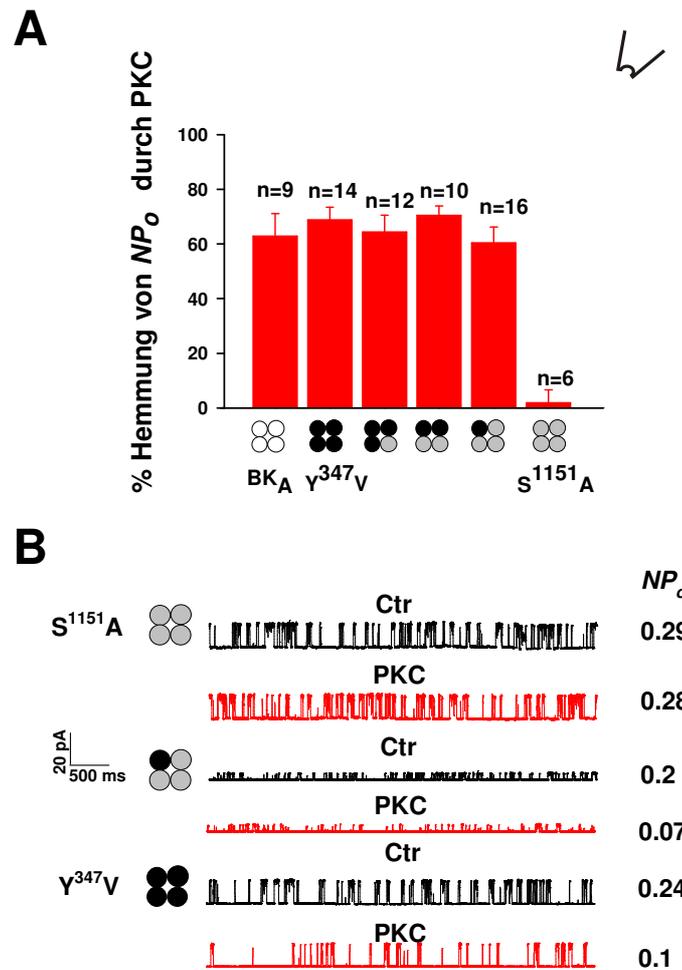


Abbildung 3.32 Für die PKC-induzierte Hemmung genügt die Phosphorylierung einer α -Untereinheit des tetrameren BK-Kanals.

A: Dargestellt ist die PKC-induzierte prozentuale NP_o-Hemmung der möglichen Zusammensetzungen des tetrameren BK_A-Kanals bei Koexpression der PKC-resistenten Mutante S¹¹⁵¹A und der Porenmutante Y³⁴⁷V. Weiterhin ist die PKC-induzierte Hemmung von NP_o des homotetrameren nicht-mutierten BK_A-Kanals (BK_A) und die fehlende PKC-Hemmung der homotetrameren Mutante S⁶⁹⁵A in Abwesenheit von TEA dargestellt. B: Gezeigt sind repräsentative Einzelkanalmessungen vor (control, schwarz) und nach Gabe von PKC (rot). Weiße Kreise: BK_A-Kanal α -Untereinheiten; schwarze Kreise: Porenmutanten α -Untereinheiten; graue Kreise: α -Untereinheiten der PKC-resistenten Mutante S¹¹⁵¹A; ✓ = Inside-out-Konfiguration

3.9 Regulation des BK-Kanals im nativen System

Im Folgenden wurden Untersuchungen an nativen Zellen durchgeführt, um die in HEK293-Zellen dargestellte PKC-Regulation des BK-Kanals nachzuweisen. Hierfür wurden BK-Kanäle aus der Mastrachea näher untersucht, da in einer bereits veröffentlichten Arbeit unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass die Stimulation des Muskarinrezeptor-Subtyp M_2 (M_2R) durch den Muskarinrezeptor-Agonisten Carbachol (CCh) die Aktivität von nativen BK-Kanälen aus der Mastrachea über zwei unterschiedliche Mechanismen hemmt. Erstens über eine direkte $G_i\beta\gamma$ -induzierte Hemmung und zweitens über die Aktivierung der PKC (Zhou et al., 2008).

Für die folgenden Untersuchungen wurden frisch isolierte glatte Muskelzellen der Atemwege (TSMCs: tracheal smooth muscle cells) verwendet. Die Versuche wurden bei einer Ca^{2+} -Konzentration von $0.3 \mu M$ in der Meßpipette durchgeführt, auf die nachfolgend noch näher eingegangen wird. Der BK-Kanal ist durch das Skorpiongift Iberiotoxin selektiv inhibierbar (Galvez et al., 1990). In Experimenten mit diesem Toxin konnte an TSMCs gezeigt werden, dass bei einem Haltepotential von $-10 mV$ der BK-Kanalstrom für 90 % des *Whole-cell*-Stroms verantwortlich ist (nicht dargestellt). Da offensichtlich noch andere, nicht näher identifizierte Auswärtsströme mit ca. 10 % am Gesamtstrom beteiligt sind, wurden Auswärtsströme als I_{out} und nicht als I_{BK} wie in HEK293-Zellen bezeichnet. Im Folgenden wurden TSMCs im *Whole-cell*-Modus auf die Wirkung von $10 \mu M$ CCh untersucht. Es zeigte sich, dass bei allen Potentialen eine Hemmung des Stroms nach Applikation mit $10 \mu M$ CCh zu beobachten war. Bei einem Potential von $+80 mV$ betrug der Kontrollstrom (Stromdichte) in 16 Messungen $130.0 \pm 22.2 pA/pF$ und wurde nach Applikation mit $10 \mu M$ CCh auf $69.0 \pm 8.3 pA/pF$ reduziert, was einer Hemmung um $46.0 \pm 4.7\%$ entspricht (Abbildung 3.33A). Die durch CCh induzierte Hemmung des BK-Stroms konnte weder durch die Gabe eines spezifischen PKG-Aktivators ($300 \mu M$, 8-pCPT-cGMP) noch eines PKA-Aktivators ($300 \mu M$, Sp-5,6-DCI-cBIMPS) signifikant verändert werden (Abbildung 3.33A). Wurden TSMCs im *Whole-cell*-Modus mit

300 μM 8-pCPT-cGMP oder 300 μM Sp-5,6-DCI-cBIMPS in Abwesenheit von CCh behandelt, kam es zu einer ausschließlichen PKG-induzierten Erhöhung von I_{out} um $63.1 \pm 5.2 \%$ ($n=6$) bei einem Potential von +80 mV (Abbildung 3.33B). In sechs Messungen führte die Applikation von 300 μM 8-pCPT-cGMP zu einer Zunahme des Stroms von 125.7 ± 18.2 pA/pF auf 205.2 ± 25.1 pA/pF (+80 mV). Um zu überprüfen, ob α -Untereinheiten des G_s -Proteins, die nach Aktivierung von β -Adrenozeptoren freigesetzt werden, den BK-Kanal direkt aktivieren, wurden Versuche mit dem β -Adrenozeptor Agonisten Isoprenalin durchgeführt. Die Superfusion des Patches mit 10 μM Isoprenalin zeigte in sieben Messungen keine Wirkung auf den BK-Strom, was eine PKA-unabhängige Aktivierung durch G_s -Untereinheiten ausschließt (Abbildung 3.33B). Um den aktivierenden Effekt des PKG-Aktivators und den fehlenden Effekt des PKA-Aktivators auf den BK-Strom zu bestätigen, wurden zusätzlich Versuche in der *Inside-out*-Konfiguration unter Verwendung von 300 nM PKA bzw. PKG durchgeführt. In Abbildung 3.33C ist die Kanaloffenwahrscheinlichkeit (NP_o) gegen die Spannung aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Aktivierung des BK-Kanals durch die PKG zu einer Linksverschiebung von $V_{1/2}$ gegenüber der Kontrolle führt (Kontrolle: 32.1 ± 3.6 mV; PKG 7.1 ± 2.6 mV, $n=10$), während $V_{1/2}$ nach Gabe von PKA in neun Messungen keine Veränderung gegenüber der Kontrolle zeigt (PKA: 32.7 ± 3.9 mV). Der mittlere Kontrollstrom in Abbildung 3.33C wurde aus 10 Versuchen mit der PKG und neun Versuchen mit der PKA zusammengefasst. Aus Abbildung 3.33C ist weiterhin zu erkennen, dass $V_{1/2}$ von nativen BK-Kanälen gegenüber den in HEK293-Zellen exprimierten BK-Kanälen nach links zu negativeren Potentialen verschoben ist (vergl. Abbildung 3.8A), obwohl die Versuche in HEK293-Zellen bei 1 μM Ca^{2+} und die Versuche in TSMCs bei 0.3 μM Ca^{2+} durchgeführt wurden. Dies lässt sich damit erklären, dass in nativen Zellen BK-Kanäle aus α - und β -Untereinheiten zusammengesetzt sind, und die Anwesenheit der β -Untereinheit zu einer deutlichen Zunahme der Ca^{2+} -Sensitivität führt (Dworetzky et al., 1996).

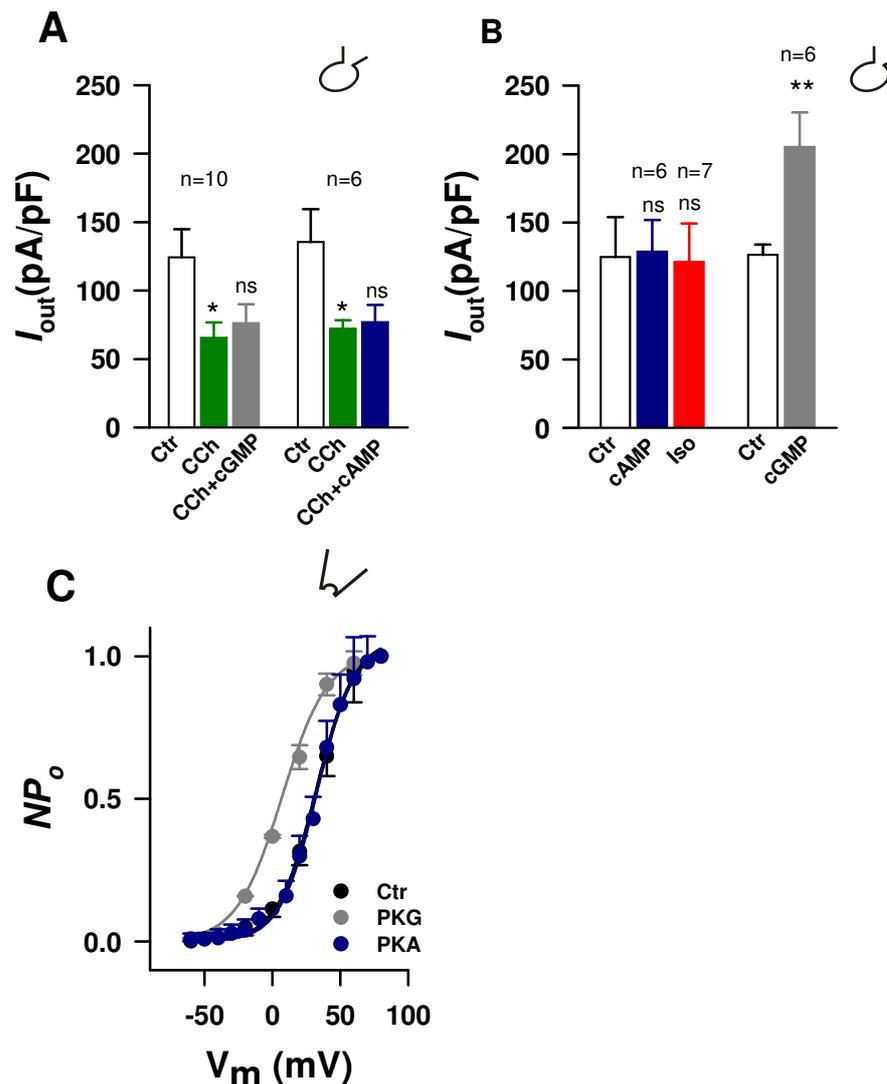


Abbildung 3.33 In Abwesenheit von CCh wird der BK-Kanal durch die PKG aktiviert

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE der errechneten Stromdichten bei einer Messspannung von +80 mV. A: 10 μ M CCh führt in 16 Messungen zu einer 50 %igen Hemmung des I_{out} und verhindert die Aktivierung durch PKG-Aktivatoren (cGMP=300 μ M 8-pCPT-cGMP) und PKA-Aktivoren (cAMP=300 μ M Sp-5,6-DCl-cBIMPS). * $p < 0.05$ verglichen gegenüber der Kontrolle (Ctr); ns= nicht signifikant gegenüber CCh B: In Abwesenheit von CCh haben 300 μ M cAMP und 10 μ M Isoprenalin keine Wirkung auf I_{out} , während cGMP zu einer Zunahme des I_{out} führt. ** $p < 0.01$ verglichen gegenüber der Ctr; ns= nicht signifikant gegenüber der Ctr. n= Anzahl der Messungen. C: Dargestellt sind Inside-out-Messungen. Aufgetragen sind die ermittelten NP_o -Werte gegen die Spannung (V_m). \circ =Whole-cell-Konfiguration \surd =Inside-out-Konfiguration.

Um zu zeigen, dass der Verlust der PKG-Aktivierung in Anwesenheit von CCh über die PKC induziert wird, wurden TSMCs im *Whole-cell*-Modus für fünf Minuten mit dem PKC-Inhibitor Ro 31-8220 (1 μ M) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 10 μ M CCh superfundiert, was wie in

Abbildung 3.34 zeigt, zu einer Abnahme des Stroms um $19.8 \pm 2.2 \%$ führte, da BK-Kanäle partiell auch über $G_i\beta\gamma$ -Untereinheiten gehemmt werden (Zhou et al., 2008). Abbildung 3.34 zeigt weiterhin, dass die Gabe von $300 \mu\text{M}$ 8-pCPT-cGMP zu einer Zunahme des Stroms führte. Die Zunahme von I_{out} um $66.0 \pm 8.9 \%$ ist vergleichbar mit dem Ergebnis an unvorbehandelten Zellen (Abbildung 3.33B, $63.1 \pm 5.2 \%$).

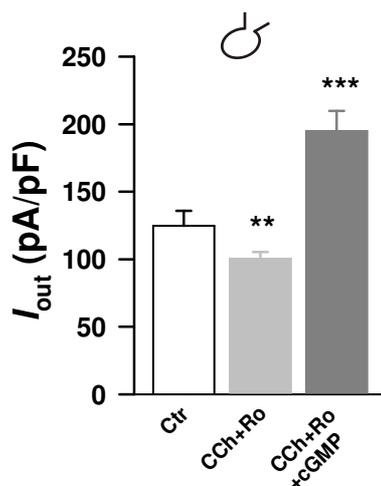


Abbildung 3.34 Die CCh-induzierte Hemmung beruht auf der Aktivierung der PKC

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SE der errechneten Stromdichten bei einem Potential von $+80 \text{ mV}$. CCh+Ro= Stromdichte nach Gabe von $10 \mu\text{M}$ CCh und $1 \mu\text{M}$ Ro 31-8220, CCh+Ro+cGMP=Stromdichte nach Gabe von $10 \mu\text{M}$ CCh, $1 \mu\text{M}$ Ro 31-8220 und $300 \mu\text{M}$ 8-pCPT-cGMP. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ verglichen gegenüber der Kontrolle (Ctr) ⊗ =Whole-cell-Konfiguration.

Im folgenden Versuch sollte noch überprüft werden, ob analog zum heterologen Expressionssystem auch in nativen Zellen die Dephosphorylierung des BK-Kanals zu einem Wechsel von der PKG- zur PKA-Regulation des BK-Kanals führt. Um alle PKC-Phosphorylierungsstellen zu dephosphorylieren wurden im *Inside-out*-Modus TSMCs in einer ATP-freien Lösung zunächst mit dem Inhibitor-Peptid PKC₁₉₋₃₁ ($5 \mu\text{M}$) superfundiert. Unter kontinuierlicher Gabe des Inhibitor Peptids wurde anschließend die ATP-freie Lösung gegen eine 3 mM ATP-haltige Lösung ersetzt und der Patch mit 300 nM PKG bzw. PKA superfundiert. Aus Abbildung 3.35 wird deutlich, dass native BK-Kanäle im dephosphorylierten Zustand nur noch durch die PKA aktiviert wurden, analog zu der im heterologen Expressionssystem untersuchten Mutante S¹¹⁵¹A (Abbildung 3.18B). NP_o betrug in sechs Messungen bei einem Potential von $+40 \text{ mV}$ 0.4 ± 0.05 vor und 0.4 ± 0.04 nach Gabe von 300 nM PKG und 0.5 ± 0.03 vor und 1.2 ± 0.17 nach Gabe von 300 nM PKA. In Abbildung 3.36

sind zusätzlich Originalaufnahmen von Einzelkanalöffnungen bei einem Messpotential von +40 mV dargestellt.

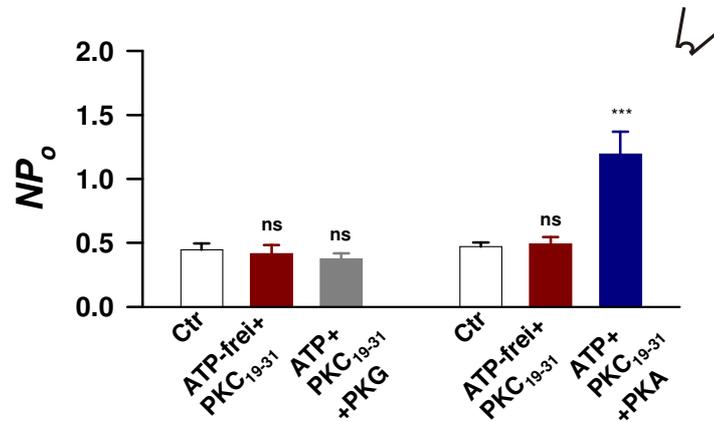


Abbildung 3.35 Aufhebung der PKC-abhängigen Phosphorylierung des BK-Kanals führt zu einem Wechsel von der PKG- zur PKA-Aktivierung

Dargestellt sind die ermittelten NP_o-Werte des BK_A-Kanals in der Inside-out-Konfiguration bei einem Potential von +40 mV. Der Patch wurde zunächst für fünf Minuten mit ATP-freier Lösung plus 5 μM PKC₁₉₋₃₁ superfundiert (braune Balken) und anschließend mit einer 3 mM ATP-haltigen Lösung plus 5 μM PKC₁₉₋₃₁ und 300 nM PKA (dunkelblau) oder PKG (dunkelgrau) ***p<0.001 verglichen gegenüber der Kontrolle (Ctr); ns= nicht signifikant gegenüber der Ctr. ✓=Inside-out-Konfiguration

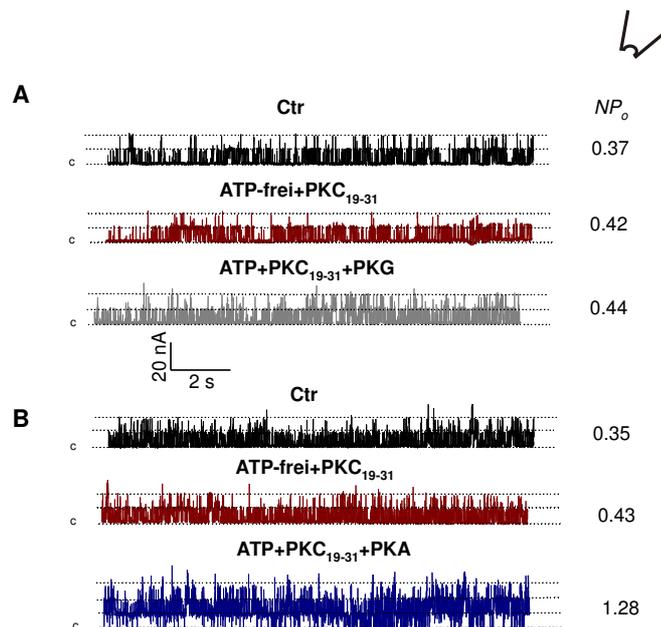


Abbildung 3.36 In Anwesenheit des PKC-Inhibitors PKC₁₉₋₃₁ wird der BK-Kanal durch die PKA aktiviert

Dargestellt sind Ausschnitte aus Einzelkanalöffnungen bei einem Membranpotential von +40. In A und B wurde der Patch zunächst für fünf Minuten mit ATP-freier Lösung plus 5 μM PKC₁₉₋₃₁ superfundiert und anschließend mit einer 3 mM ATP-haltigen Lösung plus 5 μM PKC₁₉₋₃₁ und 300 nM PKG (dunkelgrau) oder PKA (dunkelblau). Zusätzlich sind die entsprechenden NP_o-Werte dargestellt. c (closed)= geschlossener Zustand des Kanals. ✓=Inside-out-Konfiguration

Die in Abbildung 3.35 und 3.36 gezeigten Ergebnisse an *Inside-out*-Patches legen die Vermutung nahe, dass eine Proteinphosphatase mit dem Kanal assoziiert sein muss, die für die Dephosphorylierung des BK-Kanals in der ATP-freien Lösung verantwortlich ist. Wurden TSMCs im *Inside-out*-Modus für fünf Minuten mit dem Proteinphosphatase 1 Inhibitor-Peptid (20 nM, PPI2) superfundiert, führte dies in 13 Messungen zu einer Abnahme von NP_o um 50 % (von 0.4 ± 0.03 auf 0.2 ± 0.02 bei einem Potential von +40 mV, Abbildung 3.37A). Die zusätzliche Gabe von 300 nM PKG bzw. PKA führte zu keiner signifikanten Erhöhung von NP_o . Wurde der Patch neben 20 nM PPI2 zusätzlich mit dem PKC-Inhibitor Ro 31-8220 (1 μ M) superfundiert, konnte keine signifikante Abnahme von NP_o gegenüber der Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 3.37B). Die zusätzliche Applikation mit 300 nM PKG führte jedoch zu einer 2.6-fachen Erhöhung von NP_o , die von 0.5 ± 0.06 auf 1.3 ± 0.15 anstieg (+40 mV, n=6). Wurden zusätzliche Versuche in Gegenwart von Okadainsäure durchgeführt, die bei einer Konzentration von 3 nM die Proteinphosphatase 2A hemmt (Widmer et al., 2003), dann konnte keine Änderung von NP_o gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Dies impliziert, dass die Proteinphosphatase 1 nicht aber die Proteinphosphatase 2A an der PKC-Regulation des BK-Kanals beteiligt ist.

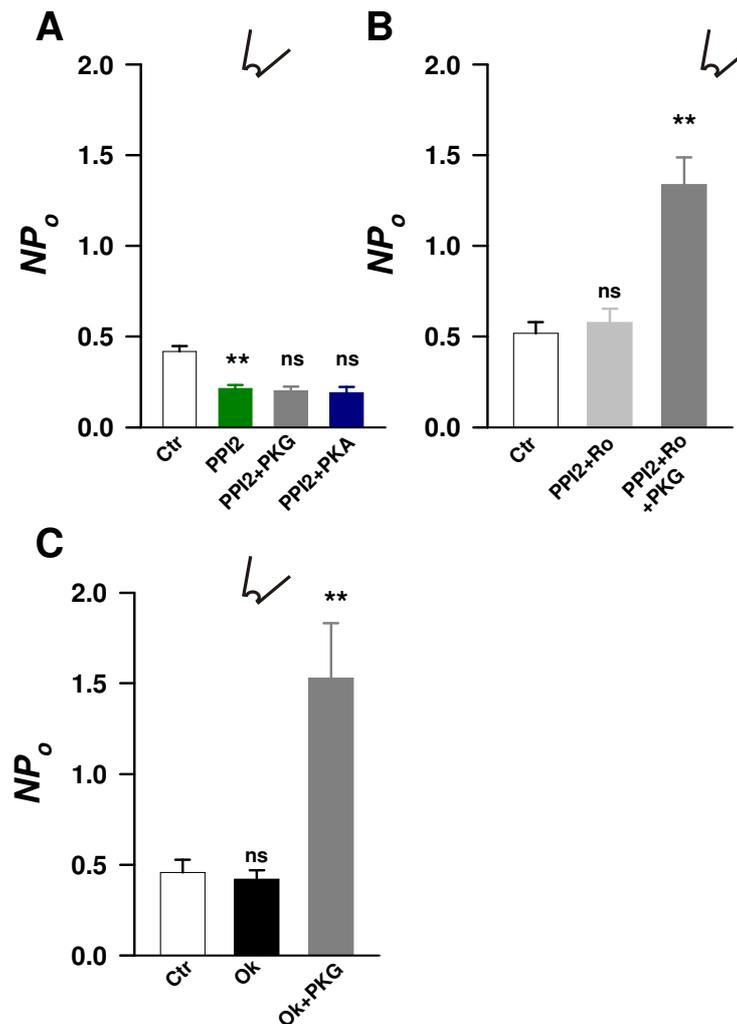


Abbildung 3.37 Proteinphosphatase 1 ist an der Regulation des BK-Kanals beteiligt

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SE der ermittelten NP_o-Werte bei einem Messpotential von +40 mV. In A, B und C wurden zunächst Kontrollmessungen (Ctrl) ohne Zugabe von Wirkstoffen aufgezeichnet. A: Die Gabe von 20 nM PPI2, ein Proteinphosphatase 1 Inhibitor-Peptid, führte zu einer Hemmung von NP_o um 50 % gegenüber der Kontrolle. Diese Hemmung konnte weder durch die Gabe von 300 nM PKG noch 300 nM PKA aufgehoben werden. B: Erst die Inhibition der PKC durch 1 μ M Ro 31-8220 führte zu einer Aktivierung des BK-Kanals durch 300 nM PKG. C: Die Proteinphosphatase 2A hat keinen Einfluss auf die Regulation des BK-Kanals. OK= Okadainsäure. **p<0.01 gegenüber der Kontrolle (Ctrl); ns= nicht signifikant gegenüber der Ctrl. ✓=Inside-out-Konfiguration

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität des BK-Kanals im nativen System (TSMCs) wie in HEK293-Zellen durch die PKC gehemmt wird. In Abwesenheit der PKC wird der native Kanal nur durch die PKG und im dephosphorylierten Zustand des Kanals nur durch die PKA aktiviert. Wird der BK-Kanal zuvor durch die PKC gehemmt, so kann der Kanal weder durch die PKA noch durch die PKG aktiviert werden. Die Beobachtung, dass sowohl

die PKC als auch die Hemmung der Proteinphosphatase 1 durch PPI2 zu einer Abnahme von NP_o des BK-Kanals in zellfreien *Inside-out*-Patches führt, spricht dafür, dass die PKC und die Proteinphosphatase 1 mit dem BK-Kanal assoziiert sind, die durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung den Kanal regulieren.

4 DISKUSSION

BK-Kanäle werden ubiquitär sowohl in erregbaren als auch in nicht-erregbaren Geweben exprimiert. Die ubiquitäre Verteilung legt nahe, dass die BK-Kanäle an zahlreichen physiologischen Mechanismen beteiligt sind. So tragen sie in glatten Muskelzellen u.a. zur Regulation des Muskeltonus bei, indem sie einen negativen Rückkopplungsmechanismus zur Limitierung einer Kontraktion vermitteln. Durch den über BK-Kanäle generierten Auswärtsstrom wird das Membranpotential repolarisiert, woraufhin spannungsabhängige Kalziumkanäle geschlossen werden. Die Regulation des BK-Kanals wird neben Depolarisation und Ca^{2+} auch durch weitere Faktoren beeinflusst. So konnte in den letzten Jahren durch zahlreiche Arbeitsgruppen nachgewiesen werden, dass die Aktivität der BK-Kanäle durch die Expression von regulatorischen β -Untereinheiten (Dworetzky et al., 1996, Wallner et al., 1999, Brenner et al., 2000, Plüger et al., 2000, Lingle et al., 2001), die Expression von Spleißformen (Tseng-Crank et al., 1994, Xie and McCobb, 1998, Shipston, 2001, Tian et al., 2001, Zhou et al., 2001), Phosphorylierung durch Serin-/Threonin-Proteinkinasen und Tyrosinkinasen (Ling et al., 2000, Schubert and Nelson, 2001), Interaktionen mit G-Proteinen (Zhou et al., 2008) und die Bildung von Makrokomplexen mit vielen transmembranären und cytosolischen Proteinen (Lu et al., 2006) beeinflusst wird.

Entsprechend der Bedeutung von Proteinkinasen für die Regulation von BK-Kanälen, weist der C-Terminus der α -Untereinheit des Kanalproteins zahlreiche putative Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen auf, so z.B. für die PKA, PKG und für die PKC (Toro et al., 1998). In den meisten untersuchten Geweben wirken sowohl die PKG als auch die PKA aktivierend auf den BK-Kanal. Im Gegensatz zur PKG und PKA zeigten Untersuchungen an Neuronen des Hippocampus (Doerner et al., 1988), an Gefäßmuskelzellen des Schweins (Minami et al., 1993) und der Ratte (Schubert et al., 1999, Barman et al., 2004, Taguchi et al., 2000), sowie an Tumorzellen aus der Rattenhypophyse (GH₄C₁ Zellen) (Shipston and Armstrong, 1996) und an corticotrophen Hypophysenzellen der Maus (AtT20 D16:16 Zellen) (Tian et al., 1999) eine Hemmung des BK-Kanals

durch Aktivierung der PKC. Als Aktivatoren der PKC wurden in den genannten Arbeiten Phorbolester wie 4 β -Phorbol 12-myristat, 13-acetat (PMA) und Phorbol 12, 13 dibutyrat (PDBu), sowie die Diacylglycerol-Analoga 1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol (OAG), 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol (DOG) und die katalytische Untereinheit der PKC eingesetzt.

Für die PKG (Alioua et al., 1998, Swayze and Braun, 2001) und PKA (Tian et al., 2004) konnte eine direkte Phosphorylierung des BK-Kanals nachgewiesen werden. So konnte im heterologen Expressionssystem gezeigt werden, dass die Mutation der entsprechenden Phosphorylierungsstellen für die PKG und PKA zu einem Verlust des Kinaseeffektes führt (Nara et al., 1998, Fukao et al., 1999, Zhou et al., 2001, Tian et al., 2001). Im Gegensatz zur PKG und PKA sind die für die PKC-induzierte Hemmung des BK-Kanals verantwortlichen molekularen Mechanismen noch unbekannt. Diese Feststellung überrascht, da die PKC an vielen Signaltransduktionsvorgängen beteiligt ist. Die Bindung einer Reihe von Neurotransmitter und Hormonen an ihre G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermittelt über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) die Freisetzung der "second messenger" Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) aus dem membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂). IP₃ bindet an IP₃-Rezeptoren in der Membran intrazellulärer Ca²⁺-Speicher (sarkoplasmatisches Retikulum) und verursacht die Freisetzung von Ca²⁺. Ca²⁺ und DAG aktivieren im Weiteren die PKC.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation des BK-Kanals durch die PKC sowohl im heterologen Expressions- als auch im nativen System mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik näher untersucht. Der Vorteil des heterologen Expressionssystems gegenüber dem nativen System liegt darin, dass durch gezielte Mutagenese die entscheidenden PKC-Phosphorylierungsstellen am BK-Kanal ermittelt werden können. Des Weiteren wurde das Zusammenspiel der PKG und PKA mit der PKC untersucht. Da BK-Kanäle als Tetramere vorliegen wurde außerdem die Stöchiometrie der PKC-Phosphorylierung untersucht.

4.1 Regulation des BK-Kanals durch die PKC im heterologen Expressionssystem

Für die Versuche im heterologen Expressionssystem wurden BK-Kanal α -Untereinheiten der Isoform A (BK_A) aus der Rindertrachea (Zhou et al., 2001) in HEK293-Zellen exprimiert und mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik untersucht. Die Isoform A enthält keine weiteren Inserts in den entsprechenden Spleißstellen und wird unter anderem auch in menschlichem Gewebe exprimiert (Tseng-Crank et al., 1994). In nicht-transfizierten HEK293-Zellen wurden nur kleine K^+ -Auswärtsströme ermittelt. Da diese K^+ -Auswärtsströme durch die Gabe von Iberiotoxin, einem spezifischen BK-Kanal-Inhibitor nicht verändert wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass HEK293-Zellen keine BK_A -Kanäle exprimieren. Durch die Expression des BK_A -Kanals in HEK293-Zellen resultierten K^+ -Auswärtsströme, die im Vergleich zu nicht-transfizierten HEK293-Zellen um den Faktor 80 (bei +80mV) größer waren. Außerdem zeigten in HEK293-Zellen exprimierte BK_A -Kanäle in Bezug auf ihre Einzelkanalleitfähigkeit, Spannungs- und Ca^{2+} -Abhängigkeit dieselben charakteristischen Merkmale wie BK-Kanäle im nativem Gewebe. Ausgehend von diesen Ergebnissen konnte die Wirkung der PKC auf den BK_A -Kanal näher untersucht werden.

In *Whole-cell*- und *Inside-out*-Versuchen wurde unter Verwendung des Phorbolesters PMA und der konstitutiv aktiven katalytischen Untereinheit der PKC eine Hemmung des BK-Kanalstroms um 50% beobachtet. Der beobachtete Hemmeffekt stimmt mit den bisher veröffentlichten Daten an glatten Muskelzellen der Blutgefäße überein (Minami et al., 1993, Schubert et al., 1999, Taguchi et al., 2000, Barman et al., 2004). Um herauszufinden, ob dieser Hemmeffekt auf eine direkte PKC-Phosphorylierung am BK_A -Kanal zurückzuführen ist, wurden alle putativen PKC-Phosphorylierungsstellen des BK_A -Kanals im C-Terminus überprüft. Eine Analyse der PKC-Phosphorylierungsstellen mit Hilfe der von Kennelly and Krebs (1991) publizierten PKC-Konsensussequenzen ergab neun putative Phosphorylierungsstellen, Ser³⁹³, Ser⁴⁹⁹, Ser⁶²⁵, Ser⁶³⁰, Ser⁶⁹⁵, Ser⁷¹², Ser¹¹²⁹, Ser¹¹⁵¹ und Ser¹¹⁵⁴. Unter diesen Phosphorylierungsstellen ist das prominente

Tandemmotiv Ser¹¹⁵¹/Ser¹¹⁵⁴ eine optimale PKC-Konsensussequenz (Kennelly and Krebs, 1991). Durch gezielte Mutagenese, bei der die beiden Serine (Ser¹¹⁵¹ und Ser¹¹⁵⁴) zusammen und einzeln durch Alanin ersetzt wurden, und somit eine Phosphorylierung an diesen Positionen nicht mehr möglich war, konnte in *Whole-cell*- und *Inside-out*-Versuchen festgestellt werden, dass Ser¹¹⁵¹ eine für die PKC-induzierte Hemmung des BK_A-Kanals essentielle Phosphorylierungsstelle ist. Der Austausch von Ser¹¹⁵¹ gegen Alanin führte zu einem kompletten Verlust des PKC-induzierten Hemmeffektes. Ein Fehlen der PKC-induzierten Hemmung konnte auch bei der natürlich vorkommenden trunkierten Isoform C (BK_C) des BK-Kanals beobachtet werden. Dieser Isoform fehlen im Vergleich zur Isoform A die letzten 23 C-terminalen Aminosäuren und somit auch das Ser¹¹⁵¹ PKC-Phosphorylierungsmotiv. Isoform C unterscheidet sich zusätzlich in den letzten drei Aminosäuren von der BK_A-Isoform (Zhou et al., 2001).

Wenn tatsächlich nur das Ser¹¹⁵¹ für die PKC-induzierte Hemmung des BK_A-Kanals verantwortlich ist, sollten BK_A-Kanäle bei denen das Ser¹¹⁵¹ gegen Aspartat (S¹¹⁵¹D) ausgetauscht wurde einen durch die PKC gehemmten BK_A-Kanal imitieren. Durch Aspartat kann die bei der Phosphorylierung auftretende negative Ladung des Phosphatrestes imitiert werden. Dies würde bedeuten, dass z.B. in *Inside-out*-Versuchen die maximale Leitfähigkeit (G) der Mutante S¹¹⁵¹D im Vergleich zu nicht-mutierten BK_A-Kanälen um 50 % geringer sein müsste. Darüber hinaus dürfte die zusätzliche Gabe von PKC keinen Einfluss mehr auf die Leitfähigkeit haben. Mit Hilfe zielgerichteter Mutagenese wurde das Ser¹¹⁵¹ gegen Aspartat ausgetauscht. Allerdings zeigte die in HEK293-Zellen exprimierte Mutante S¹¹⁵¹D im *Inside-out*-Modus nicht das erwartete Verhalten. Trotz Einführen einer negativen Ladung an Stelle von Ser¹¹⁵¹ blieb die maximale Leitfähigkeit gegenüber nicht-mutierten BK_A-Kanälen unverändert und wurde wie bei nicht-mutierten BK_A-Kanälen durch die Gabe der PKC um 50 % reduziert. Diese Beobachtungen zeigen, dass Ser¹¹⁵¹ für die PKC-induzierte Hemmung essentiell ist, jedoch scheint es nicht alleine für die Hemmung verantwortlich zu sein. Durch frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das PKC-Tandemmotiv (S¹¹⁵¹/S¹¹⁵⁴) auch Einfluss auf die

PKG- und PKA-Regulation des BK_A-Kanals hat. Der Austausch des PKC-Tandemmotivs (S¹¹⁵¹/S¹¹⁵⁴) gegen Alanin führte zu einem Wechsel von der PKG- zur PKA-Aktivierung des BK_A-Kanals. Der nicht-mutierte BK_A-Kanal wurde ausschließlich durch die PKG aktiviert, während die Mutante S¹¹⁵¹A/S¹¹⁵⁴A nur durch die PKA aktiviert wurde (Zhou et al., 2001). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Hier konnte gezeigt werden, dass der nicht-mutierte BK_A-Kanal und die Mutante S¹¹⁵¹D nur durch die PKG aktiviert wurden, während eine Aktivierung der Mutante S¹¹⁵¹A nur durch die PKA möglich war. Auch durch Dephosphorylierung des nicht-mutierten BK_A-Kanals konnte ein Wechsel von der PKG- zur PKA-Aktivierung hervorgerufen werden. Dazu wurden nicht-mutierte BK_A-Kanäle im *Inside-out*-Modus in einer ATP-freien Lösung zunächst mit dem Inhibitor-Peptid PKC₁₉₋₃₁ superfundiert, um alle PKC-Phosphorylierungsstellen zu dephosphorylieren und die PKC zu hemmen. Anschließend wurde die ATP-freie Lösung gegen eine ATP-haltige Lösung ersetzt und der Patch in Anwesenheit von PKC₁₉₋₃₁ mit der PKG bzw. PKA superfundiert.

Die Tatsache, dass die Mutante S¹¹⁵¹D wie nicht-mutierte BK_A-Kanäle durch die PKC gehemmt und durch die PKG aktiviert wird und gleichzeitig die Mutante S¹¹⁵¹A wie nicht-mutierte BK_A-Kanäle im dephosphorylierten Zustand nur durch die PKA aktiviert wird, lässt auf eine konstitutive Phosphorylierung von Ser¹¹⁵¹ in HEK293-Zellen schließen. Demzufolge müsste mindestens ein weiteres Serin durch die PKC phosphoryliert werden, um eine Hemmung des BK_A-Kanals zu induzieren.

Um dieses noch unbekanntes Serin zu identifizieren, wurden alle weiteren sieben putativen Serine einzeln durch Alanin ersetzt. Diese BK_A-Kanalmutanten wurden in HEK293-Zellen exprimiert und in der *Whole-cell*-Konfiguration auf die Wirkung von PMA untersucht. Dabei zeigten alle Mutanten, bis auf die Mutante S⁶⁹⁵A, keinen Unterschied in ihrem Verhalten gegenüber dem nicht-mutierten BK_A-Kanal. Der Austausch von Ser⁶⁹⁵ gegen Alanin führte analog zur Mutante S¹¹⁵¹A zu einem Verlust der PKC-induzierten Hemmung. Das Ser⁶⁹⁵ befindet sich im C-Terminus in einem "Linker", der sich zwischen den beiden RCK-Domänen (RCK1 und RCK2)

des BK-Kanals befindet. RCK-Domänen (regulators of conductance of K⁺-channels) haben einen entscheidenden Einfluss auf den Öffnungsmechanismus ("Gating") des BK-Kanals (Jiang et al. 2001). Ein Modell für das "Gating" von Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanälen beruht auf Arbeiten, die auf der Kristallstruktur des bakteriellen K⁺-Kanals MthK aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* basieren (Jiang et al., 2002a, 2002b). Dieser Kanal gehört zur Gruppe der K⁺-Kanäle, die aus 2 Transmembransegmenten und einer Pore aufgebaut sind (2TM-1P) und durch die Erhöhung der cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration geöffnet werden. Analog zum BK-Kanal setzt sich der MthK-Kanal aus einer tetrameren Struktur zusammen. Jede der vier Untereinheiten besitzt C-terminal zwei, d.h. insgesamt acht RCK-Domänen (jeweils vier RCK1 und vier RCK2 Domänen). Die Strukturanalyse des MthK zeigte, dass sich diese acht RCK-Domänen in Anwesenheit von Ca²⁺ um den Kanaleingang auf der cytoplasmatischen Seite anordnen und einen "Gating-Ring" bilden. Durch die Bindung von Ca²⁺ wird Energie freigesetzt, die zur Öffnung des Kanals führt. Auch für den BK-Kanal konnte ein ähnliches Modell für das "Gating" beschrieben werden. In einer Arbeit von Niu et al. (2004) konnte gezeigt werden, dass eine Änderung in der Länge des Abschnitts zwischen dem S6-Segment und der RCK1-Domäne Auswirkungen auf das "Gating" des BK-Kanals hat. Dabei führten kürzere Abschnitte zu einer Zunahme, längere zu einer Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit des BK-Kanals. Zusammen mit den Arbeiten an dem MthK-Kanal wurde ein Modell entworfen, das besagt, dass die Bindung von Ca²⁺ an den "Gating-Ring" zu einem Zug an dem S6-RCK1-Abschnitt führt (mechanosensitiv) und letztendlich zu einem Öffnen des Kanals. Für die Ca²⁺-Bindung des BK-Kanals sind bisher zwei Bindungsregionen bekannt. Eine dieser Bindungsregionen, die aus zwei Asparaginsäureresten und einem Methioninrest bestehen, befindet sich in der RCK1-Domäne. Die zweite Bindungsregion, bestehend aus fünf Asparaginsäureresten, befindet sich in der RCK2-Domäne und wird als "Ca²⁺-bowl" bezeichnet (Yusifov et al., 2008).

Um auch am Ser⁶⁹⁵ einen phosphorylierten Zustand zu imitieren, wurde das Ser⁶⁹⁵ gegen Aspartat ausgetauscht (S⁶⁹⁵D) und in HEK293-Zellen exprimiert.

In *Inside-out*-Messungen konnte festgestellt werden, dass die maximale Leitfähigkeit der Mutante S⁶⁹⁵D im Vergleich zur Mutante S¹¹⁵¹D und zu nicht mutierten BK_A-Kanälen um die Hälfte reduziert war und somit der Leitfähigkeit von nicht-mutierten BK_A-Kanälen im PKC-gehemmten Zustand entsprach. Gleiche Ergebnisse wurden auch bei BK_A-Kanalmutanten ermittelt, bei denen sowohl Ser⁶⁹⁵ als auch Ser¹¹⁵¹ gegen Aspartat (S⁶⁹⁵D/S¹¹⁵¹D) oder Ser⁶⁹⁵ gegen Aspartat und Ser¹¹⁵¹ gegen Alanin (S⁶⁹⁵D/S¹¹⁵¹A) ausgetauscht wurden. Anhand der Mutante S⁶⁹⁵D/S¹¹⁵¹A wurde deutlich, dass nur das Ser⁶⁹⁵ für die PKC-induzierte Hemmung des BK_A-Kanals verantwortlich ist, da durch den Austausch von Ser¹¹⁵¹ gegen Alanin eine Phosphorylierung durch die PKC an dieser Position verhindert war. Unter physiologischen Bedingungen kann die PKC-induzierte Hemmung allerdings nur dann erfolgen, wenn Ser¹¹⁵¹ bereits phosphoryliert vorliegt. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass weder die PKG noch die PKA den BK_A-Kanal aktivieren kann, wenn Ser⁶⁹⁵ durch die PKC phosphoryliert vorliegt oder sich eine negative Ladung an dieser Position befindet.

Der BK-Kanal wird somit über zwei Phosphorylierungsstellen (Ser⁶⁹⁵ und Ser¹¹⁵¹) durch die PKC gehemmt. Im Gegensatz zur PKC regulieren andere Serin-/Threoninkinasen wie die PKG oder die PKA den BK-Kanal über die Phosphorylierung nur einer essentiellen Phosphorylierungsstelle an der porenbildenden α -Untereinheit (Alioua et al., 1995, Alioua et al., 1998, Nara et al., 1998, Fukao et al., 1999, Zhou et al., 2001, Tian et al., 2004). In den meisten bisher untersuchten Geweben besitzt sowohl die PKA als auch die PKG aktivierende Eigenschaften auf den BK-Kanal (Übersicht bei Schubert and Nelson, 2001).

McHugh et al. (2000) konnten zeigen, dass in tsA-201-Zellen exprimierte L-Typ Ca²⁺-Kanäle über die PKC-Phosphorylierung von zwei sehr nahe beieinander liegenden Threoninresten (Thr²⁷ und Thr³¹) gehemmt werden. Die beiden Threonine wurden gegen Aspartat ausgetauscht, um die negative Ladung einer Phosphorylierung zu imitieren. Der Unterschied zu den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnissen liegt darin, dass für die PKC-induzierte Hemmung des BK_A-Kanals die negative Ladung an Position

695 alleine verantwortlich ist, während für die PKC-induzierte Hemmung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen beide Threonine eine negative Ladung besitzen müssen. Ferner konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die PKC nicht nur für die Hemmung der BK-Kanalaktivität verantwortlich ist, sondern auch die Wirkung anderer Proteinkinasen wie die PKG und PKA moduliert. So führt die PKC-Phosphorylierung von Ser¹¹⁵¹ alleine zu einem Wechsel von der PKA- zur PKG-Aktivierung des BK_A-Kanals, während die zusätzliche Phosphorylierung von Ser⁶⁹⁵ nicht nur eine Abnahme der NP_o -Aktivität des Kanalproteins induziert, sondern auch eine Aktivierung durch die PKG und PKA verhindert. Auch andere Autoren konnten zeigen, dass Proteinkinasen unter der Kontrolle der PKC stehen. Widmer et al. (2003) konnten an nativen BK-Kanälen von Purkinje-Neuronen aus dem Kleinhirn der Ratte zeigen, dass erst eine Phosphorylierung durch die PKC eine Aktivierung des Kanals durch die PKA ermöglicht. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Zhou et al. (2001) veröffentlicht. Hier wurde gezeigt, dass das PKC-Tandemmotiv Einfluss auf die PKG- und PKA-Regulation des BK-Kanals hat. In T Lymphozyten sind Kaliumkanäle vom "verzögerten Gleichrichter" Typ erst durch die PKA aktivierbar, wenn zuvor eine Phosphorylierung durch die PKC stattgefunden hat (Payet and Dupuis, 1992). Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass die PKC an der PKA-Regulation von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen beteiligt ist (Li et al., 1993). Des Weiteren konnte an L-Typ Ca^{2+} -Kanälen (Strauss et al., 1997, Boixel et al., 2000) und an Kaliumkanälen vom "verzögerten Gleichrichter" Typ (Strauss et al., 2002) gezeigt werden, dass neben Serin-/Threoninkinasen auch Tyrosinkinasen durch die PKC gesteuert werden.

4.2 Stöchiometrie der PKC-Phosphorylierung

BK-Kanäle setzen sich aus vier porenbildenden α -Untereinheiten zusammen und bilden eine tetramere Struktur (Shen et al., 1994, Quirk and Reinhart, 2001). Jede einzelne α -Untereinheit besitzt die beiden PKC-Phosphorylierungsstellen Ser⁶⁹⁵ und Ser¹¹⁵¹. Da BK-Kanäle einen extrazellulär gelegenen N-Terminus und einen intrazellulär gelegenen C-Terminus besitzen, können keine funktionellen Konkatemere generiert werden (Meera et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde die Sensitivität des BK-Kanals gegenüber Tetraethylammonium (TEA) ausgenutzt, um die Stöchiometrie der PKC-Phosphorylierung des BK_A-Kanals aufzuklären. Durch gezielte Mutagenese wurde das für die TEA-Sensitivität verantwortliche Tyrosin gegen Valin ausgetauscht (Y³⁴⁷V). Die innerhalb der Porenregion mutierten BK-Kanäle (Y³⁴⁷V) weisen bei verschiedenen Potentialen die gleichen Einzelkanal-Stromamplituden auf wie nicht-mutierte BK-Kanäle. In Gegenwart von 2 mM TEA jedoch, werden nicht-mutierte BK-Kanäle vollständig gehemmt, während der Strom von Y³⁴⁷V-Kanälen unverändert bleibt. Durch Koexpression von α -Untereinheiten des nicht-mutierten BK_A-Kanals und α -Untereinheiten des Y³⁴⁷V-Kanals in HEK293-Zellen konnten im *Outside-out*-Modus je nach zufälliger Zusammensetzung des Kanaltetramers in Gegenwart von 2 mM TEA in der Badlösung charakteristische Stromamplituden ermittelt werden. Während homotetramere BK_A-Kanaluntereinheiten durch TEA vollständig gehemmt wurden, konnte mit zunehmender Anzahl von Y³⁴⁷V-Kanaluntereinheiten eine lineare Erhöhung der Stromamplitude beobachtet werden, die ihr Maximum bei homotetrameren Y³⁴⁷V-Kanälen erreichte. Diese charakteristischen Stromamplituden dienten als Grundlage für die folgenden Versuche, da anhand dieser Stromamplituden die Stöchiometrie von gemischten BK_A-Kanälen bestehend aus TEA-sensitiven und TEA-insensitiven Untereinheiten ermittelt werden konnte. Aufgrund der Tatsache, dass in den PKC-resistenten Mutanten S⁶⁹⁵A und S¹¹⁵¹A das Tyr³⁴⁷ wie in nicht-mutierten BK_A-Kanälen erhalten ist, konnten α -Untereinheiten des Y³⁴⁷V-Kanals und α -Untereinheiten der PKC-resistenten Mutanten in HEK293-Zellen

koexprimiert und im *Inside-out*-Modus untersucht werden. Durch Superfusion des Patches mit PKC und mit Hilfe der charakteristischen Stromamplituden konnte herausgefunden werden, dass bereits die Phosphorylierung einer einzigen α -Untereinheit des tetrameren BK-Kanals ausreicht, um eine Hemmung des Kanals durch die PKC zu induzieren. Die prozentuale Hemmung der Offenwahrscheinlichkeit lag um 60 %.

Tian et al. (2004) gelang es mit Hilfe von $Y^{334}V$ -Kanälen (entspricht der $Y^{347}V$ Mutante in unserem BK_A -Klon) die Stöchiometrie der PKA-Phosphorylierung des BK-Kanals (Maushypophyse) mit dem STREX-Insert und dem BK-Kanal ohne Insert aufzuklären. Das STREX-Exon ist ein Teil einer Spleißvariante des BK-Kanals mit einem zusätzlichen 59 Aminosäuren umfassenden Insert. Während der BK-Kanal ohne Insert über eine einzige PKA-Phosphorylierungsstelle (Ser^{899}) verfügt, existiert in dem STREX-Insert eine weitere PKA-Phosphorylierungsstelle ($S3_{STREX}$) (Xie and McCobb, 1998, Lai and McCobb, 2002, Zhu et al., 2005). BK-Kanäle mit dem STREX-Insert werden durch die PKA gehemmt (Tian et al., 2001, Tian et al., 2004), während BK-Kanäle ohne STREX-Insert durch die PKA aktiviert werden. Für die Aktivierung des BK-Kanals ohne Insert ist dabei das Serin Ser^{899} und für die Hemmung des BK-Kanals mit dem STREX-Insert das Serin $S3_{STREX}$ verantwortlich. Obwohl der BK-Kanal mit dem STREX-Insert über beide Serinstellen verfügt, scheint nur das $S3_{STREX}$ für die PKA-induzierte Hemmung verantwortlich zu sein (Tian et al., 2001). Es fällt auf, dass sich sowohl das für die PKC-Hemmung notwendige Ser^{695} als auch das für die PKA-Hemmung notwendige $S3_{STREX}$ fast an gleicher Position in dem "Linker" zwischen den beiden RCK-Domänen des BK-Kanals befinden. Zusätzlich reicht sowohl für eine PKA-induzierte Hemmung des BK-Kanals die alle das STREX-Insert besitzen als auch für die PKC-induzierte Hemmung des BK-Kanals die Phosphorylierung nur eines Serins des Homotetramers aus (Tian et al., 2004). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Linker-Region zwischen den beiden RCK-Domänen eine wichtige Rolle für die Hemmung des BK-Kanals durch die PKC und PKA spielt. Offensichtlich wird sowohl durch die PKC-Phosphorylierung am Ser^{695} als auch durch die PKA-Phosphorylierung am $S3_{STREX}$ eine Konformationsänderung induziert,

die die Offenwahrscheinlichkeit des BK-Kanals reduziert. Im Unterschied dazu müssen bei BK-Kanälen ohne Insert alle vier Ser⁸⁹⁹ des Homotetramers phosphoryliert werden, um eine Aktivierung durch die PKA zu induzieren (Tian et al., 2004)

4.3 Regulation des BK-Kanals im nativen System

Um zu zeigen, dass die in HEK293-Zellen dargestellte PKC-Regulation des BK-Kanals auch in nativen Zellen nachgewiesen werden kann, wurden Untersuchungen an glatten Muskelzellen aus der Mastrachea durchgeführt (TSMCs: tracheal smooth muscle cells). Diese Zellen wurden aus zwei Gründen gewählt. Erstens wird in TSMCs die in HEK293-Zellen untersuchte BK_A-Isoform des BK-Kanals exprimiert, welche der „ZERO“-Mutante entspricht. Zweitens wurde in einer bereits veröffentlichten Arbeit unserer Gruppe gezeigt, dass die Stimulation des Muskarinrezeptor-Subtyp M₂ (M₂R) durch den Muskarinrezeptor-Agonisten Carbachol (CCh) die Aktivität von BK-Kanälen hemmt. Dabei wurde festgestellt, dass diese Hemmung über die PKC induziert wurde (Zhou et al., 2008). Allerdings handelte es sich nicht um einen reinen PKC-induzierten Hemmeffekt, da auch eine direkte Hemmung des BK-Kanals durch G_iβγ-Untereinheiten nachgewiesen wurde. Für die vorliegende Arbeit war jedoch der PKC-induzierte Hemmeffekt entscheidend. Die Untersuchungen ergaben, dass BK-Kanäle in TSMCs sich in ihrer Regulation durch die PKC vergleichbar verhalten wie BK-Kanäle in HEK293-Zellen. Diese Ergebnisse verdeutlichen die physiologische Relevanz der PKC-Regulation des BK-Kanals in TSMCs. In den Versuchen an HEK293-Zellen wurde die PKC-induzierte Hemmung des BK-Kanals über eine Superfusion der Zellen mit einer bereits aktivierten PKC nachgewiesen, während in TSMCs die für die Hemmung des BK-Kanals notwendige PKC über einen physiologischen Mechanismus, nämlich den M₂R aktiviert wurde. In TSMCs induzierte CCh eine 50%ige Hemmung des BK-Stroms, die weder durch Aktivatoren der PKA (Sp-5,6-DCI-cBIMPS) noch durch Aktivatoren der PKG (8-pCPT-cGMP) aufgehoben werden konnte. In Abwesenheit von CCh wurde wie in den transfizierten HEK293-Zellen eine Aktivierung durch die PKG, nicht aber durch die PKA beobachtet. Wurden TSMCs neben CCh

zusätzlich mit Ro 31-8220 superfundiert, einem Inhibitor für alle PKC-Isoformen (Wilkinson et al., 1993), konnte der CCh-induzierte Hemmeffekt größtenteils aufgehoben werden. Dies bestätigt, dass die PKC für die Hemmung des BK-Stroms verantwortlich ist. In diesem PKC-gehemmten Zustand führte die Gabe des PKG-Aktivators zu einer Zunahme des BK-Stroms, während der PKA-Aktivator keine signifikante Auswirkung auf den Strom hatte. Der Grund dafür, dass der CCh-induzierte Hemmeffekt in Anwesenheit des PKC-Hemmers nur partiell aufgehoben wird liegt darin, dass BK-Kanäle auch direkt über $G_i\beta\gamma$ -Untereinheiten gehemmt werden. Zhou et al. (2008) zeigten, dass in TSMCs die direkte Applikation von gereinigten $G_i\beta\gamma$ -Untereinheiten auf die cytosolische Seite eines *Inside-out*-Patches zu einer Hemmung der Offenwahrscheinlichkeit des BK-Kanals führte. Transducin- α konnte durch Bildung eines inaktiven Heterotrimers die inhibitorische Wirkung von $G_i\beta\gamma$ wieder aufheben.

Der an S¹¹⁵¹A-Mutanten beobachtete Wechsel von der PKG- zur PKA-Aktivierung des BK-Kanals, sollte auch in TSMCs untersucht werden, indem *Inside-out*-Patches in einer ATP-freien Lösung in Anwesenheit des PKC-Inhibitor-Peptids (PKC₁₉₋₃₁) vorbehandelt und anschließend mit der PKG bzw. PKA superfundiert wurden. Es zeigte sich, dass dieser Wechsel auch in TSMCs nachgewiesen werden konnte. Da aber in HEK293-Zellen gezeigt wurde, dass Ser¹¹⁵¹ konstitutiv phosphoryliert vorliegt, müsste Ser¹¹⁵¹ auch in TSMCs zuvor durch eine Proteinphosphatase dephosphoryliert werden, um eine Aktivierung durch die PKA zu ermöglichen. Dies bedeutet, dass der native BK-Kanal mit einer Proteinphosphatase assoziiert sein muss. Wurden *Inside-out*-Patches mit einem Proteinphosphatase 1 Inhibitor-Peptid (PPI2) superfundiert, konnte eine Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit um 50 % beobachtet werden, die weder durch die PKG noch durch die PKA aufgehoben werden konnte. Diese Hemmung war PKC-abhängig, da in Anwesenheit von Ro 31-8220 die Hemmung aufgehoben war und eine Aktivierung durch die PKG möglich wurde. Die Hemmung der Proteinphosphatase 2A durch 3 nM Okadainsäure (Cohen et al., 1989) hatte im Vergleich zu PPI2 keine Wirkung auf die BK-Kanalaktivität. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in dem zellfreien *Inside-out*-Patch sowohl

eine Proteinphosphatase 1 als auch eine PKC mit dem BK-Kanal assoziiert ist, die über ein Wechselspiel von PKC und Proteinphosphatase 1 darüber entscheiden, ob Ser⁶⁹⁵ phosphoryliert wird oder nicht. Wird Ser⁶⁹⁵ durch die PKC phosphoryliert, wird der BK-Kanal gehemmt und eine Aktivierung durch die PKG und PKA ist nicht mehr möglich. Liegt Ser⁶⁹⁵ dephosphoryliert vor, kann der BK-Kanal durch die PKG oder PKA aktiviert werden. Diese Ergebnisse könnten eine Erklärung dafür sein, warum in der Literatur unterschiedliche Befunde bezüglich der PKA- und PKG-Regulation des BK-Kanals in verschiedenen Geweben beschrieben werden. Dadurch, dass das Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung durch die PKC und Dephosphorylierung durch die Proteinphosphatase 1 sich in verschiedenen Geweben und unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen unterscheiden kann, könnte sich der BK-Kanal in unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen befinden, was dazu führt, dass das Kanalprotein entweder durch die PKG oder durch die PKA aktiviert werden kann. Des Weiteren widerlegen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse mit Phosphatase-Inhibitoren Theorien einiger Autoren, die vermuten, dass BK-Kanäle indirekt über Proteinkinasen reguliert werden. White et al. (1993) zeigten, dass BK-Kanäle in GH₄C₁-Zellen durch das atriale natriuretische Peptid (ANP) aktiviert werden. ANP verursacht durch Aktivierung von membranständigen Guanylylcyclasen (GC) einen Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration. cGMP aktiviert die PKG, welche wiederum den BK-Kanal aktiviert. Da die aktivierende Wirkung von ANP auf den BK-Kanal durch den Proteinphosphatase Inhibitor Okadainsäure aufgehoben werden konnte, nahm White et al. (1993) an, dass die über ANP aktivierte PKG den BK-Kanal nicht direkt aktiviert, sondern eine Proteinphosphatase stimuliert, die wiederum den BK-Kanal durch Dephosphorylierung aktiviert. Auch andere Autoren vermuteten einen ähnlichen indirekten Mechanismus (Furukawa et al., 1996, Zhou et al., 1996). Die vorliegenden Ergebnisse widerlegen eindeutig die Hypothese, dass BK-Kanäle durch Dephosphorylierung aktiviert werden. Die Anwesenheit von Protein-Phosphatase-Inhibitoren ermöglicht die Phosphorylierung von Ser⁶⁹⁵ durch eine mit dem Kanal assoziierte PKC. Die Folge ist eine Hemmung des BK-Kanals. Die Ergebnisse zeigen also, dass

der BK-Kanal nicht indirekt, sondern direkt durch Proteinkinasen reguliert wird.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine komplexe PKC-abhängige Phosphorylierung des BK-Kanals nicht nur die Offenwahrscheinlichkeit des Kanalproteins reduziert, sondern auch Einfluss auf die Regulation des Kanals durch andere Proteinkinasen wie die PKG und PKA hat. Dies hat zur Folge, dass in TSMCs durch die PKC-induzierte Hemmung des BK-Kanals eine Kontraktion gefördert und gleichzeitig durch die Aufhebung der PKG- und PKA-Aktivierung eine Relaxation unterbunden wird. Die hier vorgestellte komplexe und streng kontrollierte Regulation des BK-Kanals zeigt, dass durch die PKC die Funktion des BK-Kanals als negativen Rückkopplungs Regulator der Zell-Erregbarkeit aufgehoben werden kann und umgewandelt wird in eine positive Rückkopplung zur Verstärkung einer PKC-regulierten Kontraktion.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation des BK-Kanals durch die PKC mit der *Patch-Clamp*-Technik elektrophysiologisch untersucht. Dazu wurden HEK293-Zellen transient mit der cDNA des BK_A-Kanals transfiziert und native Zellen aus der Mastrachea verwendet. Aus den Untersuchungen ergaben sich folgende Schlussfolgerungen:

1. Sowohl in HEK293-Zellen als auch in nativen Zellen wird die Offenwahrscheinlichkeit (NP_o) des BK-Kanals durch die PKC reduziert ohne die Einzelkanalleitfähigkeit zu beeinflussen.
2. Mittels zielgerichteter Mutagenese, bei denen alle putativen PKC-Phosphorylierungsstellen so verändert wurden, dass eine Phosphorylierung an diesen Stellen nicht mehr möglich war, konnten zwei für die PKC-Regulation essentielle Serine (Ser⁶⁹⁵ und Ser¹¹⁵¹) identifiziert werden.
3. Für die PKC-induzierte Hemmung ist das Ser⁶⁹⁵ verantwortlich. Dieses Ser⁶⁹⁵ befindet sich in dem "Linker" zwischen den beiden RCK-Domänen (RCK1 und RCK2, regulators of conductance of K⁺-channels), die einen entscheidenden Einfluss auf den Öffnungsmechanismus des BK-Kanals haben. Die Phosphorylierung von Ser⁶⁹⁵ ist dabei konditional und abhängig von der Phosphorylierung von Ser¹¹⁵¹.
4. Ser¹¹⁵¹ hat neben der PKC-Regulation auch Einfluss auf die PKA- und PKG-Regulation des BK-Kanals. Wenn Ser¹¹⁵¹ phosphoryliert vorliegt (konstitutiv), ist eine Aktivierung durch die PKG möglich. Durch Dephosphorylierung des Ser¹¹⁵¹ kann eine Aktivierung durch die PKA erfolgen. Sind beide Serine (Ser⁶⁹⁵ und Ser¹¹⁵¹) phosphoryliert wird eine PKG- und PKA-Aktivierung verhindert.
5. Die Phosphorylierung einer einzigen α -Untereinheit des tetrameren BK-Kanals reicht aus, um eine Hemmung des Kanals durch die PKC zu induzieren.

6. BK-Kanäle in glatten Muskelzellen aus der Mastrachea verhalten sich in ihrer Regulation durch die PKC vergleichbar wie BK-Kanäle in HEK293-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des Muskarinrezeptor-Subtyp M_2 (M_2R) durch den Muskarinrezeptor-Agonisten Carbachol (CCh) die Aktivität von BK-Kanälen hemmt. Nähere Untersuchungen zeigten, dass die PKC für die CCh-induzierte Hemmung verantwortlich ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der BK-Kanal mit der PKC und der Proteinphosphatase 1 (PP1) assoziiert, die über ein Wechselspiel von PKC und PP1 den Kanal regulieren. Diese Beobachtung widerlegt Theorien, die eine indirekte Regulation des BK-Kanals durch Proteinkinasen vermuten.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die PKC-Regulation des BK-Kanals über zwei Phosphorylierungsschritte (Ser⁶⁹⁵ und Ser¹¹⁵¹) erfolgt. Die beiden Serine sind zudem nicht nur für die PKC-induzierte Hemmung des BK-Kanals verantwortlich, sondern auch für die Aktivierung des BK-Kanals durch die PKG und PKA. Diese kooperative Regulation des BK-Kanals durch die PKC, PKG und PKA erlaubt die Aktivierung oder Hemmung des Kanals durch die entsprechenden Proteinkinasen und verdeutlicht seine Wichtigkeit bei der Kontraktion der glatten Muskulatur, wodurch eine Kontraktion gefördert oder beendet werden kann.

SUMMARY

Large conductance, voltage- and Ca^{2+} -activated potassium channels (BK channels) are important regulators in excitable cells and are potently regulated by protein kinases. Protein kinases such as PKG, PKA and PKC can modulate BK channels. Whereas PKG- and PKA-induced channel activation in smooth muscle has been extensively studied, the molecular mechanism of BK channel inhibition by PKC is unknown. We have used the patch-clamp technique to investigate the regulation of BK channels by PKC in HEK293 cells and in cell-free patches of native smooth muscle cells. We show that PKC inhibits BK channel open state probability by phosphorylation of Ser⁶⁹⁵. This Ser⁶⁹⁵ is located in the linker between the two regulators of K⁺ conductance domains (RCK1 and RCK2). Phosphorylation of Ser⁶⁹⁵ is conditional, depending on the unconditional phosphorylation of Ser¹¹⁵¹ which is part of a tandem PKC motif at the C-terminal end. We demonstrate that phosphorylation of Ser¹¹⁵¹ switches channel activation from PKA to PKG, whereas conditional phosphorylation of Ser⁶⁹⁵ renders the BK channel insensitive to either PKG or PKA. In addition, inhibition of BK channels by PKC depends on phosphorylation of only a single α -subunit in the channel tetramer at Ser¹¹⁵¹ and Ser⁶⁹⁵. In native smooth muscle cells the regulation of BK channel activity by PKC is identical to that observed at the recombinant channels expressed in HEK293 cells. In addition, protein phosphatase 1 inhibitor peptide (PPI2) mimic the effects of PKC, thereby disproving the concept of an indirect regulation of BK channels by protein kinases via phosphatases. Accordingly, the phosphorylation state of Ser⁶⁹⁵ depends on the balance between PKC and protein phosphatase 1 (PP1), which are associated with BK channels.

Thus, unconditional and conditional phosphorylation by PKC provides smooth muscle cells with a powerful mechanism to render BK channels sensitive or insensitive to PKG or PKA, and to support smooth muscle contraction by blunting the negative feedback mechanism of BK channels.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Adelman JP, Shen KZ, Kavanaugh MP, Warren RA, Wu YN, Lagrutta A, Bond CT and North RA (1992) Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron* **9**: 208-216

Alioua A, Huggins JP and Rousseau E (1995) PKG-I α phosphorylates the α -subunit and upregulates reconstituted GK_{Ca} channels from tracheal smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **268**: L1057-L1063

Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P and Toro L (1998) The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, hsl α , is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J. Biol. Chem.* **273**: 32950-32956

Ananthanarayanan B, Stahelin RV, Digman MA and Cho W (2003) Activation mechanisms of conventional protein kinase C isoforms are determined by the ligand affinity and conformational flexibility of their C1 domains. *J. Biol. Chem.* **278**: 46886-46894

Ashcroft FM (1999) Ion channels and disease. Academic Press, San Diego, San Francisco

Atkinson NS, Robertson GA and Ganetzky B (1991) A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus. *Science* **253**: 551-555

Barman SA, Zhu S and White RE (2004) Protein kinase C inhibits BK_{Ca} channel activity in pulmonary arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **286**: L149-L155

Benham CD and Bolton TB (1986) Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of rabbit. *J. Physiol.* **381**: 385-406

Benkusky NA, Fergus DJ, Zuccherro TM and England SK (2000) Regulation of the Ca²⁺-sensitive domains of the Maxi-K channel in the mouse myometrium during gestation. *J. Biol. Chem.* **275**: 27712-27719

Boixel C, Tessier S, Pansard Y, Lang-Lazdunski L, Mercadier J-J and Hatem SN (2000) Tyrosine kinase and protein kinase C regulate L-type Ca^{2+} current cooperatively in human atrial myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **278**: H670-H676

Brayden JE and Nelson MT (1992) Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* **256**: 532-535

Brenner R, Pérez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MD and Aldrich RW (2000) Vasoregulation by the β_1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* **404**: 870-876

Butler A, Tsunoda S, McCobb DP, Wei A and Salkoff L (1993) mslo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* **261**: 221-224

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Kikkawa U and Nishizuka Y (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipids-dependent protein kinase by tumor-promoting Phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **257**: 7847-7851

Cheng H, Lederer WJ and Cannell MB (1993) Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* **262**: 740-744

Cho W (2001) Membrane targeting by C1 and C2 domains. *J. Biol. Chem.* **276**: 32407-32410

Choe S (2002) Potassium channel structures. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**: 115-121

Cohen and Cohen PTW (1989) Protein phosphatases come of age. *J. Biol. Chem.* **264**: 21435-21438

Coussens L, Parker PJ, Rhee L, Yang-Feng TL, Chen E, Waterfield MD, Francke U and Ullrich A (1986) Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* **233**: 859-866.

Coussens L, Rhee L, Parker PJ, and Ullrich A (1987) Alternative splicing increases the diversity of the human protein kinase C family. *DNA* **6**: 389-394

Doerner D, Pitler TA and Alger BE (1988) Protein kinase C activators block specific calcium and potassium components in isolated hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **8**: 4069-4078

Du W, Bautista JF, Yang H, Diez-Sampedro A, You S-A, Wang L, Kotagal P, Lüders HO, Shi J, Cui J, Richerson GB and Wang QK (2005) Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder. *Nat. Genet.* **37**: 733-738

Dworetzky SI, Trojnecki JT and Gribkoff VK (1994) Cloning and expression of a human large-conductance calcium-activated potassium channel. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* **27**: 189-193

Dworetzky SI, Boissard CG, Lum-Ragan JT, McKay MC, Post-Munson DJ, Trojnecki JT, Chang CP and Gribkoff VK (1996) Phenotypic alteration of a human BK (hSlo) channel by hSlo β subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation *J. Neurosci.* **16**: 4543-4550

Fabiato A (1988) Computerprograms for calculating total specified free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Method Enzymol.* **157**: 378-341

Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B and Keef KD (1999) Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BK_{Ca} channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J. Biol. Chem.* **274**: 10927-10935

Furukawa K, Barger SW, Blalock EM and Mattson MP (1996) Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted β -amyloid-precursor protein. *Nature* **379**: 74-78

Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1990) Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from the venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J. Biol. Chem.* **265**: 11083-11090

Gollasch M, Wellman GC, Knot HJ, Jaggar JH, Dannon DH, Bonev AD and Nelson MT (1998) Ontogeny of local sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} signals in cerebral arteries. *Circ. Res.* **83**: 1104-1114

Grygorczyk R and Schwarz W (1983) Properties of the Ca^{2+} -activated K^+ conductance of human red cells as revealed by the patch clamp technique. *Cell Calcium* **4**: 499-510

Hille B (1992) Ion channels of excitable membranes. Sunderland, MA: Sinauer. 2nd edition

Hille B (2001) Ion channels of excitable membranes. Sunderland, MA: Sinauer. 3rd edition

House C and Kemp BE (1987) Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* **238**: 1726-1728

Hug H and Sarre TF (1993) Protein kinase C isozymes: divergence in signal transduction? *Biochem J.* **291**: 329-343

Jaggar JH, Porter VA, Lederer WJ and Nelson MT (2000) Calcium sparks in smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **278**: C235-56

Jensen BS, Strobaek D, Christophersen P, Jorgensen TD, Hansen C, Silahtaroglu A, Olesen S-P and Ahring PK (1998) Characterization of the cloned intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel. *Am. J. Physiol.* **275**: C848-C856

Jiang Y, Pico A, Cadene M, Chait BT and MacKinnon R (2001) Structure of the RCK domain from the *E. coli* K^+ channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron.* **29**: 593-601

Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chat BT and MacKinnon R (2002a) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* **417**: 515-522

Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chat BT and MacKinnon R (2002b) The open pore conformation of potassium channels. *Nature* **417**: 523-526

Johnson JE, Giorgione J and Newton AC (2000) The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain. *Biochemistry* **39**: 11360-11369

Joiner WJ, Wang LY, Tang MD and Kaczmarek LK (1997) hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **94**: 11013-11018

Kaczorowski GJ, Knaus HG, Leonard RJ, McManus OB and Garcia ML (1996) High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**: 255-67

Kennelly PJ and Krebs EG (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**: 15555-15558

Kishimoto A, Kajikawa N, Shiota M and Nishizuka Y (1983) Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipids-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease. *J. Biol. Chem.* **258**: 1156-1164

Knaus HG, Folander K, Garcia-Calvo M, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Smith M and Swanson R (1994) Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel from smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **269**: 17274-17278

Köhler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J and Adelman JP (1996) Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* **273**: 1709-1714

Kume H, Graziano MP and Kotlikoff MI (1992) Stimulatory and inhibitory regulation of calcium-activated potassium channels by guanine nucleotide-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 11051-11055

Lai G-J and McCobb DP (2002) Opposing actions of adrenal androgens and glucocorticoids on alternative splicing of Slo potassium channels in bovine chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 7722-7727

Latorre R, Oberhauser A, Labarca P and Alvarez O (1989) Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* **51**: 385-399

Li M, West JW, Numann R, Murphy BJ, Scheuer T and Catterall WA (1993) Convergent regulation of sodium channels by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science* **261**: 1439-1442

Ling S, Woronuk G, Sy L, Lev S and Braun AP (2000) Enhanced activity of a large conductance, calcium-sensitive K^+ Channel in the presence of Src tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **275**: 30683-30689

Lingle CJ, Zeng XH, Ding JP and Xia XM (2001) Inactivation of BK channels mediated by the NH(2) terminus of the beta3b auxiliary subunit involves a two-step mechanism: possible separation of binding and blockade. *J. Gen. Physiol.* **117**: 583-606

Lu R, Alioua a, Kumar Y, Eghbali M, Stefani E and Toro L (2006) MaxiK channel partners: physiological impact. *J. Physiol.* **570.1**: 65-72

Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marmé D and Schächtele C (1993) Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976. *J. Biol. Chem.* **268**: 9194-9197

McHugh D, Sharp EM, Scheuer T and Catterall WA (2000) Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**: 12334-12338

Meera P, Wallner M, Jiang Z and Toro L (1996) A calcium switch for the functional coupling between α (hsl α) and β subunits ($K_{v,Ca}\beta$) of maxi K channels. *FEBS Letters* **382**: 84-88

Meera P, Wallner M, Song M and Toro L (1997) Large conductance voltage- and calcium-dependent K^+ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **94**: 14066-14071

Meera P, Wallner M and Toro L (2000) A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca^{2+} -activated K^+ channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 5562-7.

Mellor H and Parker PJ (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* **332**: 281-292

Meredith AL, Thorneloe KS, Werner ME, Nelson MT and Aldrich RW (2004) Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel. *J. Biol. Chem.* **279**: 36746-36752

Mermi J, Yajima M and Ebner G (1991) The control of the contraction of myocytes from guinea-pig heart by the resting membrane potential. *Brit. J. Pharmacol.* **104**: 705-713

Minami K, Fukuzawa K and Nakaya Y (1993) Protein kinase C inhibits the Ca^{2+} -activated K^+ channel of cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**: 263-269

Morrow JP, Zakharov SI, Liu G, Yang L, Sok A and Marx SO (2006) Defining the BK channel domains required for β 1-subunit modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 5096-5101

Nara M, Dhilipala PDK, Wang Y-X and Kotlikoff MI (1998) Reconstitution of β -adrenergic modulation of large conductance, calcium-activated potassium (Maxi-K) channels in *Xenopus* oocytes. Identification of the cAMP-dependent protein kinase phosphorylation site. *J. Biol. Chem.* **273**: 14920-14924

Neer EJ (1994) G proteins: Critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci.* **3**: 3-14

Neer EJ (1995) Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**: 249-257

Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ and Lederer WJ (1995) Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* **270**: 633-636

Newton AC (1995b) Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation. *J. Biol. Chem.* **270**: 28495-28498

Newton AC (1997) Regulation of Protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 161-167

Newton AC (2001) Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem.Rev.* **101**: 2353-2364

Newton AC (2003) Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J.* **370**: 361-371

Nishizuka Y (1986) Perspectives on the role of protein kinase C in stimulus-response coupling. *J. Natl. Cancer Inst.* **76**: 363-370

Nishizuka Y (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**: 484-96

Niu X and Magleby KL (2002) Stepwise contribution of each subunit to the cooperative activation of BK channels by Ca^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 11441-11446

Niu X, Qian X and Magleby KL (2004) Linker-gating ring complex as passive spring and Ca^{2+} -dependent machine for a voltage- and Ca^{2+} -activated potassium channel. *Neuron* **42**: 745-756

Oancea E and Meyer T (1998) Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* **95**: 307-318

Ochoa WF, Garcia-Garcia J, Fita I, Corbalan-Garcia S, Verdaguer N and Gomez-Fernandez JC (2001) Structure of the C2 domain from novel protein kinase C ϵ . A membrane binding model for Ca^{2+} -independent C2 domains. *J. Mol. Biol.* **311**: 837-849

Ono Y, Fuji T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K and Nishizuka Y (1987) Identification of three additional members of rat protein kinase C family: δ -, ϵ - and ζ -,subspecies. *FEBS Letters* **226**: 125-128

Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K and Nishizuka Y (1988) The structure, expression and properties of additional members of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.* **263**: 6927-6932

Orio P, Rojas P, Ferreira G and Latorre R (2002) New disguises for an old channel: MaxiK channel β -subunits. *News Physiol. Sci.* **17**: 156-161

Osada S-I, Mizuno K, Saido TC, Akita Y, Suzuki K, Kuroki T and Ohno S (1990) A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC η , a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J. Biol. Chem.* **265**: 22434-22440

Osada S-I, Mizuno K, Saido TC, Suzuki K, Kuroki T and Ohno S (1992) A new member of protein kinase C family, nPKC θ , predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 3930-3938

Parker PJ, Coussens L, Totty N, Rhee L, Young S, Chen E, Stabel S, Waterfield MD and Ullrich A (1986) The complete primary structure of protein kinase C-the major phorbol ester receptor. *Science* **233**: 853-859

Payet MD and Dupuis G (1992) Dual regulation of the *n* type K⁺ channel in jurkat T lymphocytes by protein kinase A and C. *J. Biol. Chem.* **267**: 18270-18273

Pérez GJ and Toro L (1994) Differential modulation of large-conductance K_{Ca} channels by PKA in pregnant and nonpregnant myometrium *Am. J. Physiol.* **266**: C1459-1463

Piskorowski R and Aldrich RW (2002) Calcium activation of BK_{Ca} potassium channels lacking the calcium bowl and RCK domains. *Nature* **420**: 499-502

Plüger S, Faulhaber J, Fürstenau M, Löhn M, Waldschütz R, Gollasch M, Haller H, Luft FC, Ehmke H and Pongs O (2000) Mice with disrupted BK channel β 1 subunit gene feature abnormal Ca²⁺ spark/STOC coupling and elevated blood pressure. *Circ. Res.* **24**: E53-E60

Pongs O (1999) Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Letters* **452**: 31-35

Quirk JC and Reinhart PH (2001) Identification of a novel tetramerization domain in large conductance K_{Ca} channels. *Neuron*. **11**: 13-23

Ron D and Kazanietz MG (1999) New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J*. **13**: 1658-1676

Rozengurt E, Rey O and Waldron RT (2005) Protein kinase D signaling. *J. Biol Chem*. **280**:13205

Ruttiger L, Sausbier M, Zimmermann U, Winter H, Braig C, Engel J, Knirsch M, Arntz C, Langer P, Hirt B, Müller M, Köpschall I, Pfister M, Münkner S, Rohbock K, Pfaff I, Rüscher A, Ruth P and Knipper M (2004) Deletion of the Ca^{2+} -activated potassium (BK) α -subunit but not the $BK\beta_1$ -subunit leads to progressive hearing loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 12922-12927

Sausbier M, Hu H, Arntz C, Feil S, Kamm S, Adelsberger H, Sausbier U, Sailer CA, Feil R, Hofmann F, Korth M, Shipston MJ, Knaus H-G, Wolfer DP, Pedroarena CM, Storm JF and Ruth P (2004) Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca^{2+} -activated K^+ channel deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 9474-9478

Sausbier M, Arntz C, Bucurenciu I, Hong Z, Zhou X-B, Sausbier U, Feil S, Kamm S, Essin K, Sailer C, Usamah A, Krippeit-Drews P, Feil R, Hofmann F, Knaus H-G, Kenyon C, Shipston MJ, Storm JF, Neuhuber W, Korth M, Schubert R, Gollasch M and Ruth P (2005) Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation* **112**: 60-68

Schubert R, Noack T and Serebryakov VN (1999) Protein kinase C reduces the K_{Ca} current of rat tail artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **276**: C648-C658

Schubert R and Nelson MT (2001) Protein kinases: tuners of the BK_{Ca} channel smooth muscle. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**: 505-512

Scornik FS, Codina J, Birnbaumer L and Toro L (1993) Modulation of coronary smooth muscle K_{Ca} channels by $G_s\alpha$ independent of phosphorylation by protein kinase A. *Am. J. Physiol.* **265**: H1460-H1465

Selbie LA, Schmitzpfeiffer C, Sheng Y and Biden TJ (1993) Molecular cloning and characterization of PKC ζ , an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 24296-24302

Sewing S, Röper J and Pongs O (1996) Struktur und Funktion spannungsabhängiger K⁺-Kanäle. *Neuroforum* **2/96**: 21-28

Shen K-Z, Lagrutta A, Davies NW, Standen NB, Adelman JP and North RA (1994) Tetraethylammonium block of *Slowpoke* calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes: evidence for tetrameric channel formation. *Pflügers Arch.* **426**: 440-445

Shipston MJ (2001) Alternative splicing of potassium channels: a dynamic switch of cellular excitability. *Trends Cell. Biol.* **11**: 353-358

Shipston MJ and Armstrong DL (1996) Activation of protein kinase C inhibits calcium-activated potassium channels in rat pituitary tumour cells. *J. Physiol.* **493.3**: 665-672

Smrcka AV and Sternweis PC (1993) Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C β by G protein α and $\beta\gamma$ subunit. *J. Biol. Chem.* **268**: 9667-9674

Sossin WS and Schwartz JH (1993) Ca²⁺-independent protein kinase Cs contain an amino-terminal domain similar to the C2 consensus sequence. *TIBS* **18**: 207-208

Strauss O, Rosenthal R, Dey D, Beninde J, Wollmann G, Thieme H and Wiederholt M (2002) Effects of protein kinase C on delayed rectifier K⁺ channel regulation by tyrosine kinase in rat retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**: 1645-1654

Strauss O, Mergler S and Wiederholt M (1997) Regulation of L-type calcium channels by protein kinase C in cultured rat and human retinal pigment epithelial cells. *FASEB J.* **11**: 859-867

Swayze RD and Braun AP (2001) A catalytically inactive mutant of type I cGMP-dependent protein kinase prevents enhancement of large conductance, calcium-sensitive K⁺ channels by sodium nitroprusside and cGMP. *J. Biol. Chem.* **276**: 19729-19737

Taguchi K, Kaneko K and Kubo T (2000) Protein kinase C modulates Ca^{2+} -activated K^+ channels in cultured rat mesenteric artery smooth muscle cells. *Biol. Pharm. Bull.* **23**: 1450-1454

Tian L, Philp JAC and Shipston MJ (1999) Glucocorticoid block of protein kinase C signalling in mouse pituitary corticotroph AtT20 D16:16 cells. *J. Physiol.* **516.3**: 757-768

Tian L, Duncan RR, Hammond MSL, Coghill LS, Wen H, Rusinova R, Clark AG, Levitan IB and Shipston MJ (2001) Alternative splicing switches potassium channel sensitivity to protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **276**: 7717-7720

Tian L, Coghill LS, McClafferty H, MacDonald SH-F, Antoni FA, Ruth P, Knaus H-G and Shipston MJ. (2004) Distinct stoichiometry of BK_{Ca} channel tetramer phosphorylation specifies channel activation and inhibition by cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 11897-11902

Toker A (1998) Signaling through protein kinase C. *Front. Biosci.* **3**: D1134-D1147

Toro L, Wallner M, Meera P and Tanaka Y (1998) $\text{Maxi-K}_{\text{Ca}}$, a unique member of the voltage-gated K channel superfamily. *News Physiol. Sci.* **13**: 112-117

Tseng-Crank J, Foster CD, Krause JD, Mertz R, Godinot N, DiChiara TJ and Reinhart PH (1994) Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca^{2+} -activated K^+ channel isoforms from human brain. *Neuron* **13**: 1315-1330

Vergara C, Latorre R, Marrion NV and Adelman JP (1998) Calcium activated potassium channels. *Curr. Opin. Neuro-biol.* **8**: 321-329

Vogalis F, Vincent T, Qureshi I, Schmalz F, Ward MW, Sanders KM and Horowitz B (1996) Cloning and expression of the large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel from colonic smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **271**: G629-G639

Wallner M, Meera P and Toro L (1999) Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca^{2+} -activated K^+ channels: a transmembrane beta-subunit homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 4137-4147

Weinstein IB (1988) The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment--twenty-seventh G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Research* **48**: 4135-4143.

Werner ME, Zvara P, Meredith AL, Aldrich RW and Nelson MT (2005) Erectile dysfunction in mice lacking the large-conductance calcium-activated potassium (BK) channel. *J. Physiol.* **567**: 545-556

White RE (1993) Potassium channel stimulation by natriuretic peptides through cGMP-dependent dephosphorylation. *Nature* **361**: 263-266

Widmer HA, Rowe ICM and Shipston MJ (2003) Conditional protein phosphorylation regulates BK channel activity in rat cerebellar Purkinje neurons. *J. Physiol.* **552.2**: 379-391

Wilkinson SE, Parker PJ and Nixon JS (1993) Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem. J.* **294**: 335-337

Wulff H, Gutman GA, Cahalan MD and Chandy KG (2001) Delineation of the cotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1 . *J. Biol. Chem.* **276**: 32040-32045

Xia X-M, Ding JP and Lingle CJ (1999) Molecular basis for the inactivation of Ca^{2+} and voltage dependent BK channels in adrenal chromaffin cells an rat insulinoma tumor cells. *J. Neurosci.* **19**: 5255-5264

Xia X-M, Ding JP, Zeng JP, Duan KL and Lingle CJ (2000) Rectification and rapid activation at low Ca^{2+} of Ca^{2+} -activated, voltage-dependent BK currents: consequences of rapid inactivation by a novel beta subunit. *J. Neurosci.* **20**: 4890-4903

Xia X-M, Zeng X and Lingle CJ (2002) Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* **418**: 880-884

Xie J and McCobb DP (1998) Control of alternative splicing of potassium channels by stress hormones. *Science* **280**: 443-446

Yusifov T, Savalli N, Gandhi CS, Ottolia M and Olcese R (2008) The RCK domain of the human BK_{Ca} channel is a calcium sensor. *PNAS* **105**: 376-381

Zhou X-B, Ruth P, Schlossmann J, Hofmann F and Korth M (1996) Protein phosphatase 2A is essential for the activation of Ca²⁺-activated K⁺ currents by cGMP-dependent protein kinase in tracheal smooth muscle and chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 19760-19767

Zhou X-B, Arntz C, Kamm S, Motejlek K, Sausbier U, Wang G-X, Ruth P and Korth M (2001) A molecular switch for specific stimulation of the BK_{Ca} channel by cGMP and cAMP kinase *J. Biol. Chem.* **276**: 43239-43245

Zhou X-B., Wulfsen I, Lutz S, Utku E, Sausbier U, Ruth P, Wieland T and Korth M (2008) M₂ muscarinic receptors induce airway smooth muscle activation via a dual, Gβγ-mediated inhibition of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity. *J. Biol. Chem.* **283**: 21036-21044

Zhu N, Eghbali M, Helguera G, Song M, Stefani E and Toro L (2005) Alternative splicing of Slo channel gene programmed by estrogen, progesterone and pregnancy. *FEBS Letters* **579**: 4856-4860

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Microliter
µmol	Micromol
A	Ampère
A; (Ala)	Alanin
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp	Ampicillin
aPKC	atypische PKC
As	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
Ca ²⁺	Kalziumion
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CCh	Carbachol
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
cPKC	konventionelle PKC
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Ctr	Kontrolle
D; (Asp)	Aspartat
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
eGFP	Grünes fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
et al.	<i>Et alii</i>
FCS	fetal calf serum
g	Gramm
G α	α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine
G $\beta\gamma$	$\beta\gamma$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEK293	Zelllinie aus humaner embryonaler Niere
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
I_{out} , I_{BK}	BK-Kanalauswärtsstrom
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa, kD	Kilodalton
kHz	Kilohertz
M	Mol/Liter r
MCS	multiple cloning site
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol/Liter
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
MW	Molekulargewicht
M Ω	Mega-Ohm

n	Anzahl der Versuche
nA	Nanoampère
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nPKC	neue PKC
NP _o	Kanaloffenwahrscheinlichkeit
N-Terminus	Amino-Terminus
Ok	Okadainsäure
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm
P	Phosphor oder Porenregion
pA	Picoampère
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDK-1	Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1
pF	Picofarad
pfu	Plaque-bildende Einheit
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ - Ionenkonzentration
PIP ₂	Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
PS	Phosphatidylserin
PTX	Pertussis-Toxin
RCK	Regulatoren der Kaliumleitfähigkeit
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodinrezeptor
s	Sekunde

S; (Ser)	Serin
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TM	Transmembransegment
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit, Mengenangabe für Enzyme
u.a.	Unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen; % v/v entspricht Volumenprozent)
V; (Val)	Valin
$V_{1/2}$	halbmaximales Aktivierungspotential
w/v	Masse pro Volumen; % w/v entspricht Massenprozent
Wt	Wildtyp
x g	Vielfaches der Gravitationsbeschleunigung der Erde
Y; (Tyr)	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Topologiemodelle der vier Hauptklassen von Kaliumkanälen..	3
Abbildung 1.2 Molekulare Struktur der α - und β -Untereinheit des BK-Kanals und seine Aktivierung	8
Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Primärstruktur der PKC- Isoformen	13
Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Kofaktor-abhängigen Aktivierung konventioneller PKC	15
Abbildung 2.1 Restriktionsschnittstellen und Primer innerhalb der BK _A -Kanal kodierenden cDNA	31
Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der Overlap-PCR.....	31
Abbildung 2.3 Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers.....	39
Abbildung 2.4 Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Patch-Clamp- Konfigurationen	42
Abbildung 3.1 Charakterisierung des in HEK293-Zellen exprimierten BK _A - Kanals	49
Abbildung 3.2 Spannungsabhängigkeit des BK _A -Kanals	50
Abbildung 3.3 Leitfähigkeitsbestimmung des BK _A -Kanals	51
Abbildung 3.4 Ca ²⁺ -Abhängigkeit des BK _A -Kanals	52
Abbildung 3.5 Hemmung des BK _A -Stroms durch den Phorbolester PMA.....	54
Abbildung 3.6 Hemmung der BK _A -Kanalaktivität durch PMA.....	55
Abbildung 3.7 Gö 6976 und Ro 31-8220 unterdrücken den PMA-induzierten Hemmeffekt auf I _{BK}	57
Abbildung 3.8 Hemmung des BK _A -Kanalstroms durch die PKC	59
Abbildung 3.9 Verlust des Hemm-effektes durch Hitzedenaturierung der PKC	60
Abbildung 3.10 Wirkung der PKC auf die Kanaloffenwahrscheinlichkeit (NP _o)	61
Abbildung 3.11 C-Terminus und Topologie-Modell der α -Untereinheit des BK- Kanals	62
Abbildung 3.12 Fehlende Regulation der BK _A -Kanal Doppelmutante S ¹¹⁵¹ A/S ¹¹⁵⁴ A durch die PKC.....	63
Abbildung 3.13 Ser ¹¹⁵¹ ist an der Hemmung des BK _A -Kanals durch die PKC beteiligt.....	65
Abbildung 3.14 Verlust des PKC-induzierten Hemmeffektes durch Mutation des Ser ¹¹⁵¹ in Alanin	66
Abbildung 3.15 Fehlende Hemmung des BK _C -Kanals durch die PKC	67

Abbildung 3.16 Aktivität der Kanalmutante S ¹¹⁵¹ D wird durch die PKC gehemmt	68
Abbildung 3.17 Regulation der Mutante S ¹¹⁵¹ D durch die PKA und PKG	69
Abbildung 3.18 Regulation des nicht-mutierten BK _A -Kanals und der Mutante S ¹¹⁵¹ A durch die PKA und PKG.....	70
Abbildung 3.19 Regulation der Isoform C (BK _C) durch die PKA und PKG....	71
Abbildung 3.20 Inhibition der PKC führt zu einem „switch“ der BK _A -Kanal-Aktivierung von PKG zur PKA	73
Abbildung 3.21 Topologie-Modell der α -Untereinheit des BK _A -Kanals	75
Abbildung 3.22 Die Mutation des Ser ⁶⁹⁵ in Alanin führt zum Verlust der PKC-induzierten Hemmung	77
Abbildung 3.23 Prozentuale Hemmung des nicht-mutierten BK _A -Kanals und der PKC-Mutanten nach Applikation von PMA.....	78
Abbildung 3.24 Untersuchung der Mutante S ⁶⁹⁵ D auf die Wirkung von PKC	79
Abbildung 3.25 Regulation der Mutante S ⁶⁹⁵ D/S ¹¹⁵¹ D durch die PKC	80
Abbildung 3.26 Wirkung von PKC auf die Mutante S ⁶⁹⁵ D/S ¹¹⁵¹ A.....	81
Abbildung 3.27 Regulation des BK _A -Kanals durch PKG und PKA nach Präinkubation mit PKC	82
Abbildung 3.28 Wirkung von PKG und PKA auf die Mutanten S ⁶⁹⁵ D, S ⁶⁹⁵ D/S ¹¹⁵¹ D und S ⁶⁹⁵ D/S ¹¹⁵¹ A in Anwesenheit von PKC.....	84
Abbildung 3.29 Topologie-Modell des nicht-mutierten BK _A -Kanals und der Mutanten Y ³⁴⁷ V, S ⁶⁹⁵ A und S ¹¹⁵¹ A.....	86
Abbildung 3.30 Einzelkanalmessungen von koexprimierten Porenmutanten- und nicht-mutierten BK _A -Kanaluntereinheiten	87
Abbildung 3.31 Die Phosphorylierung einer α -Untereinheit ist für die PKC-induzierte Hemmung ausreichend.....	89
Abbildung 3.32 Für die PKC-induzierte Hemmung genügt die Phosphorylierung einer α -Untereinheit des tetrameren BK-Kanals.	90
Abbildung 3.33 In Abwesenheit von CCh wird der BK-Kanal durch die PKG aktiviert.....	93
Abbildung 3.34 Die CCh-induzierte Hemmung beruht auf der Aktivierung der PKC.....	94
Abbildung 3.35 Aufhebung der PKC-abhängigen Phosphorylierung des BK-Kanals führt zu einem Wechsel von der PKG- zur PKA-Aktivierung	95
Abbildung 3.36 In Anwesenheit des PKC-Inhibitors PKC ₁₉₋₃₁ wird der BK-Kanal durch die PKA aktiviert.....	95
Abbildung 3.37 Proteinphosphatase 1 ist an der Regulation des BK-Kanals beteiligt.....	97

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Auflistung der PKC-Isoformen und ihre Kofaktoren.....	11
Tabelle 2.1	Zusammensetzung der Primer und die entsprechenden Restriktionsenzyme	32
Tabelle 2.2	Übersicht der PCR (Temperatur, Zeiten und Anzahl der Zyklen)	35
Tabelle 3.1	Mittelwerte und Standardfehler (SE) der aus n Messungen bei einem Potential von +80 mV ermittelten Stromdichten vor (Kontrolle) und nach Gabe von PMA.	76
Tabelle 3.2	Mittelwerte und Standardfehler (SE) der aus n Messungen bei einem Potential von +80 mV ermittelten Stromdichten vor (Kontrolle) und nach Gabe von 4- α -PMA.....	76

7.4 Vektor-Karten

CMV promoter: bases 209-863

Polylinker: bases 889-994

Sp6 promoter: bases 999-1016

BGH poly A: bases 1018-1249

SV40 promoter: bases 1790-2115

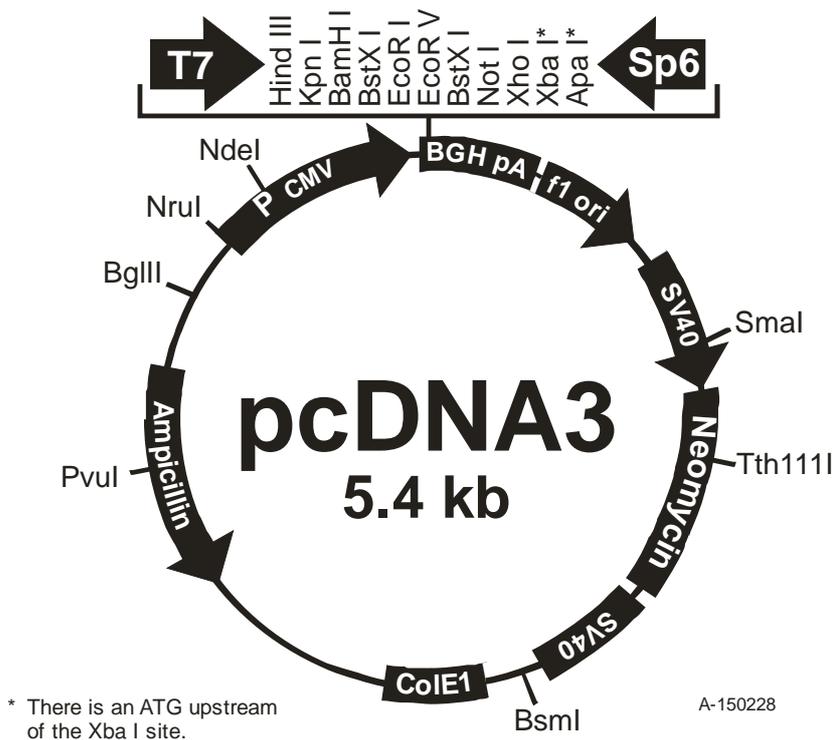
SV40 origin of replication: bases 1984-2069

Neomycin ORF: bases 2151-2945

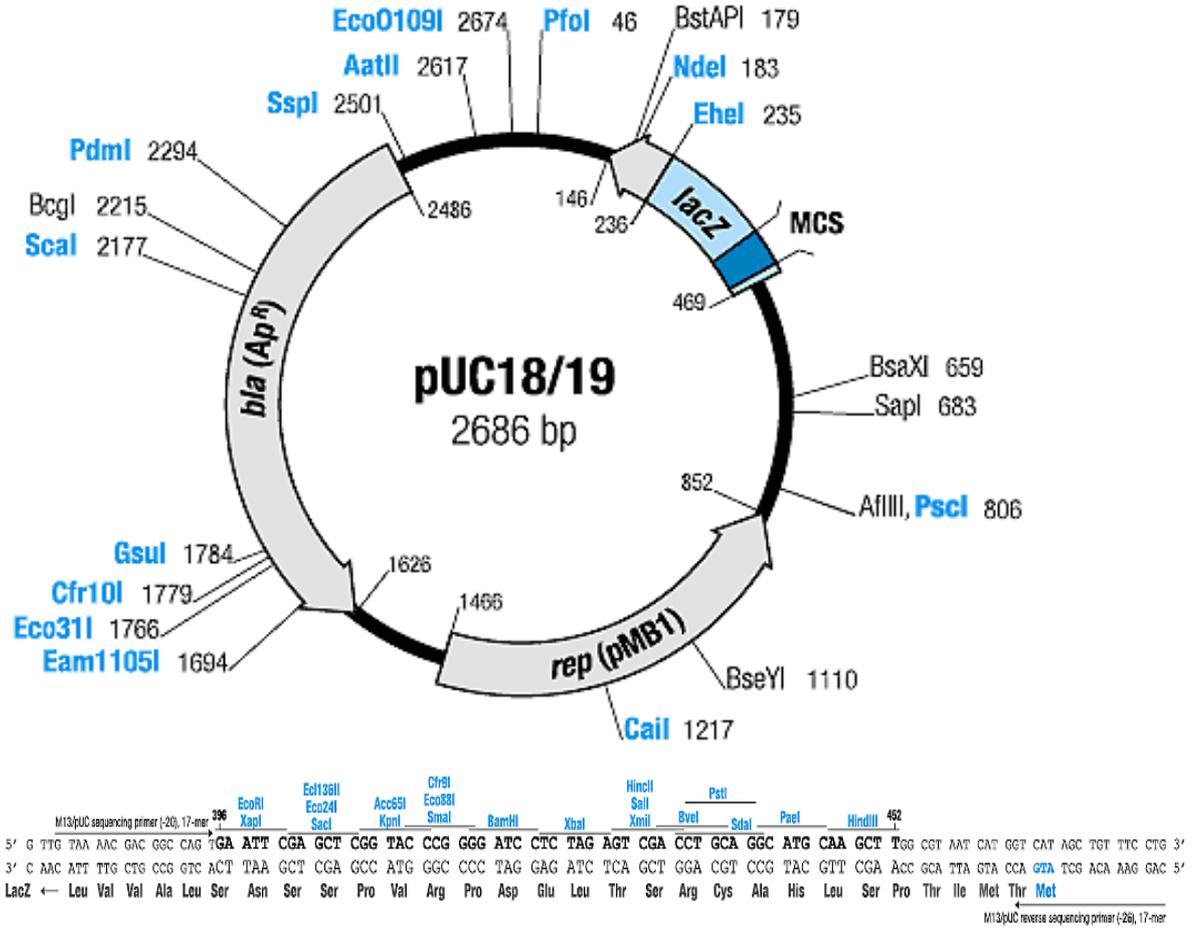
SV40 poly A: bases 3000-3372

ColE1 origin: bases 3632-4305

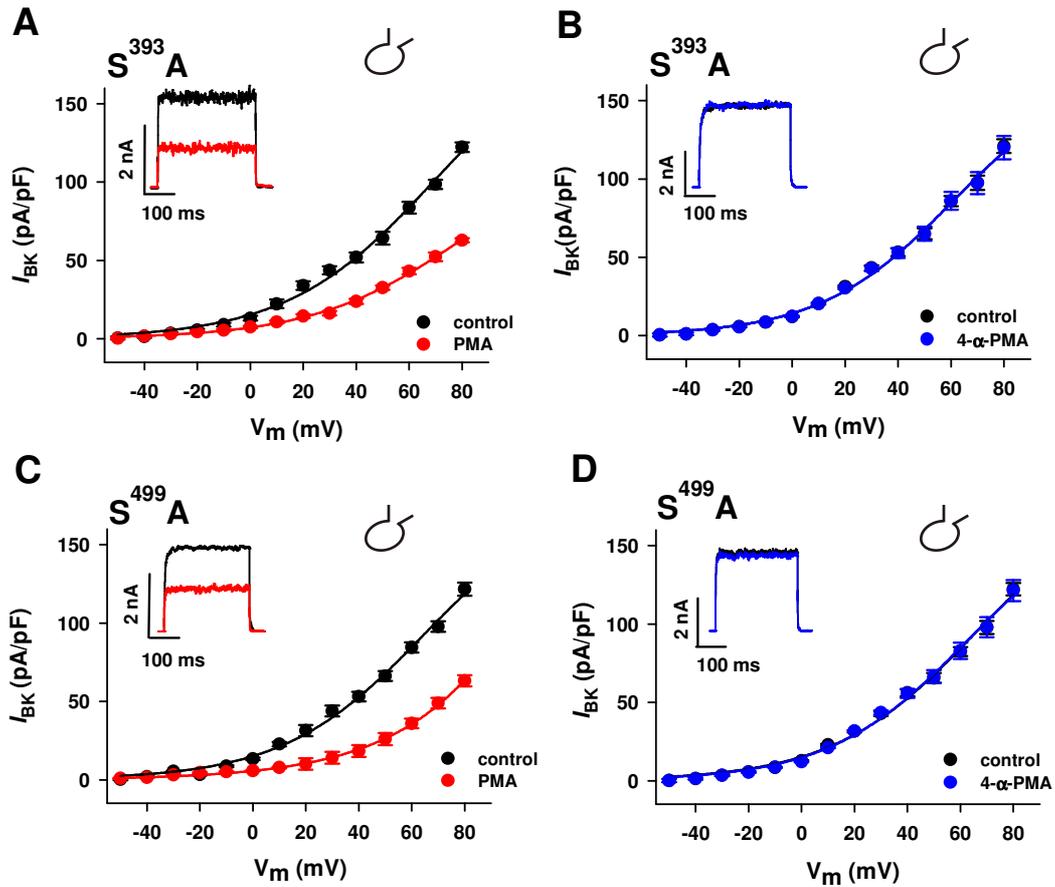
Ampicillin ORF: bases 4450-5310



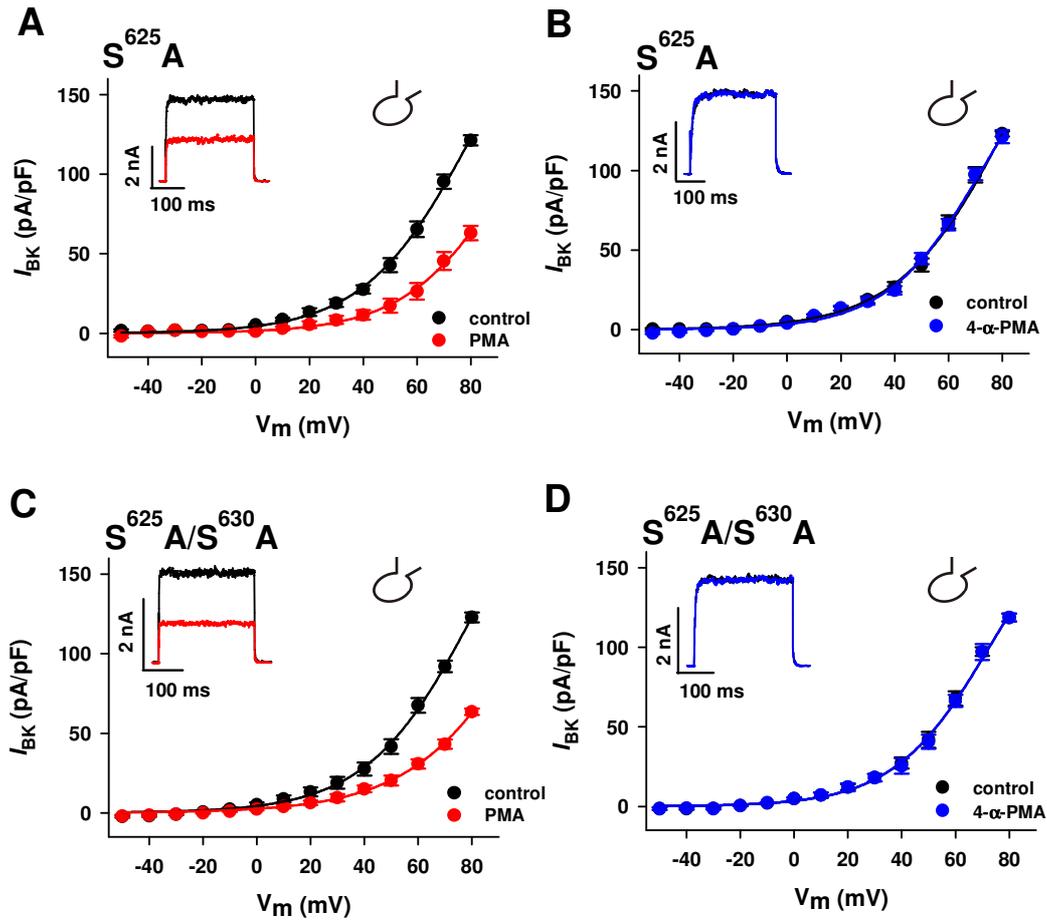
The sequence of pcDNA3 has been compiled from information in sequence databases, published sequence s. and other sources. This vector has not yet been completely sequenced. If you suspect an error in th e sequence, please contact Invitrogen's Technical Services Department.



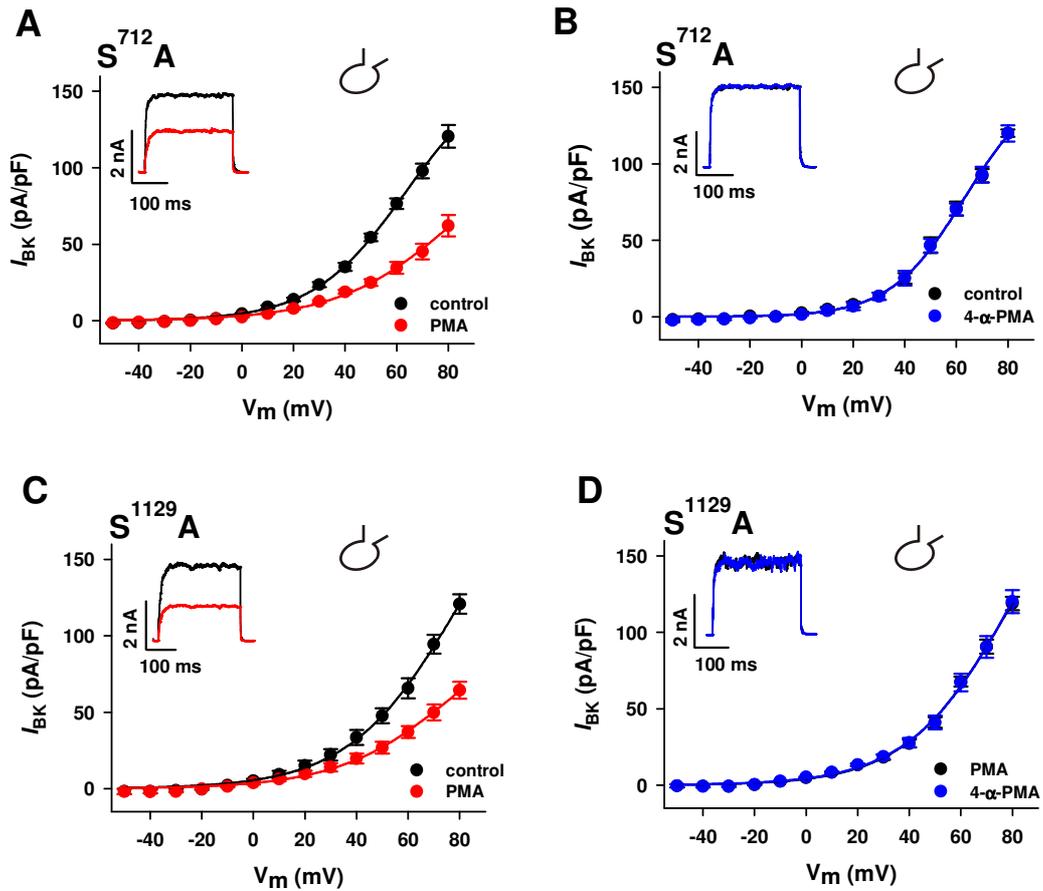
7.5 Abbildungen



Whole-cell Strom-Spannungs-Kurven der Mutanten $S^{393}A$ (A, $n=11$) und $S^{499}A$ (C, $n=11$) vor (schwarz) und nach Applikation von 100 nM PMA (rot). Weiterhin sind Strom-Spannungs-Kurven der Mutanten $S^{393}A$ (B, $n=6$) und $S^{499}A$ (D, $n=6$) vor (schwarz) und nach Applikation des inaktiven Analogons 4- α -PMA dargestellt (blau). Aufgetragen ist die Spannung (mV) gegen die Stromdichte (pA/pF). $[Ca^{2+}]_i$ in der Pipette betrug 1 μ M. Die repräsentativen Originalströme sind bei einem Potential von +80 mV dargestellt.  = Whole-cell-Konfiguration



Dargestellt sind Strom-Spannungs-Kurven der Mutanten $S^{625}A$ (A, $n=11$) und $S^{625}A/S^{630}A$ (C, $n=12$) vor (schwarz) und nach Applikation von PMA (rot). Als Negativkontrolle sind Strom-Spannungs-Kurven vor (schwarz) und nach Applikation von 4- α -PMA dargestellt (blau) ($S^{625}A$: B, $n=7$; $S^{625}A/S^{630}A$: D, $n=6$). Aufgetragen ist die Spannung (mV) gegen die Stromdichte (pA/pF). $[Ca^{2+}]_i$ in der Pipette betrug $1 \mu M$. Zusätzlich sind repräsentative Originalströme bei einem Potential von +80 mV dargestellt. \circ = Whole-cell-Konfiguration



Dargestellt sind Whole-cell Strom-Spannungs-Kurven der Mutanten $S^{712}A$ (A, $n=9$) und $S^{1129}A$ (C, $n=14$) vor (schwarz) und nach Applikation von PMA (rot). Als Negativkontrolle sind Strom-Spannungs-Kurven vor (schwarz) und nach Applikation von 4- α -PMA dargestellt (blau) ($S^{712}A$: B, $n=6$; $S^{1129}A$: D, $n=6$). Aufgetragen ist die Spannung (mV) gegen die Stromdichte (pA/pF). $[Ca^{2+}]_i$ in der Pipette betrug $1 \mu M$. Die Originalaufnahmen zeigen repräsentative Ströme bei einem Potential von $+80$ mV. \odot =Whole-cell-Konfiguration

7.6 Substanzen mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsratschlägen

Carbachol	R: 25	S: 45
Collagenase	R: 36/37/38-42/43	S: 22-24-37
EDTA	R: 36/37	S: 22-24/25
Ethanol	R: 11	S: (2)-7-16
Ethidiumbromid	R: 22-26-36/37/38-40	S: 26-28.1-36/37/39-45
GTP	R: 23/24/25-36/37/38	S: 22-26-36-45
HCl	R: 36/37/38	S: 26
Hyalurinodase	R: 42	S: 22-24/25
Isoprenalin	R: 36/37/38	S: 26-36
Isopropanol	R: 11-36-67	S: (2)-7-16-24/25-26
Kalciumchlorid	R: 36	S: 22-24
Kaliumchlorid	R: 26	S: 26-36
KOH	R: 22-35	S: 26-36/37/38-45
Magnesiumchlorid	R: 36/37/38	S: 26-36/39
Methanol	R: 11-23/25	S: 7-16-24-45
NaOH	R: 34	S: 26-36/37/39-45
Natriumchlorid	R: 36/37/38	S: 26-36
Natriumhydroxid	R: 35	S: (1/2)-26-37/39-45
Okadainsäure	R: 23/24/25-38	S: 22-26-36/37/39-45
Papain	R: 36/37/38-42	S: 22-24-26-36/37
Trypsin/EDTA	R: 36/37/38/-42	

7.7 Lebenslauf

Persönliche Daten:	Name:	Emine Utku
	Geburtsdatum:	20.04.1981
	Geburtsort:	Hamburg
	Staatsangehörigkeit:	deutsch
	Familienstand:	verheiratet
Schulbildung:	1987 - 1993	Grundschule
	1993 - 2000	Gymnasium
Schulabschluss:	Allgemeine Hochschulreife	
Studium:	SS 2001 Beginn des Biotechnologiestudiums an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg.	
	Diplomprüfung: 02. Mai 2005	
Promotion:	seit Mai 2005 im Labor von Prof. Dr. med. M. Korth am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Pharmakologie für Pharmazeuten Dezember 2009: Abschlussprüfung zur Promotion	

7.8 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden und auch nicht veröffentlicht worden.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

Hamburg, den

Unterschrift

7.9 Verzeichnis der wissenschaftlichen Arbeiten

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert:

Originalarbeiten:

Zhou X-B., Wulfsen I, Lutz S, Utku E, Sausbier U, Ruth P, Wieland T and Korth M (2008) M₂ muscarinic receptors induce airway smooth muscle activation via a dual, Gβγ-mediated inhibition of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity. *J. Biol. Chem.* **283**, 21036-21044

Kongressbeiträge:

M₂ muscarinic receptors induce airway smooth muscle activation via a dual, Gβγ-mediated inhibition of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity (2008) Zhou X-B., Wulfsen I, Lutz S, Utku E, Sausbier U, Ruth P, Wieland T and Korth M

7.10 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben, herzlich bedanken:

- Herrn Prof. Dr. med. Michael Korth für die Bereitstellung des Themas und die gute wissenschaftliche Betreuung.
- Herrn Prof. Dr. rer. nat. Peter Heisig für die Übernahme des zweiten Gutachtens.
- Den Mitarbeitern Herrn Dr. med. Xiao-Bo Zhou, Frau Waltraud Krüger, Frau Dr. rer. nat. Iris Wulfsen und Herrn Dr. rer. nat. Marco Mewe des Instituts Pharmakologie für Pharmazeuten für die gute Zusammenarbeit und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft.
- Meinen Eltern und meinem Ehemann, die mir in schwierigen Situationen immer wieder Mut gemacht haben.