

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PHYSIOLOGIE
PROF. DR. MED. ARMIN KURTZ*
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Einfluss der β -Untereinheiten hKCNE1-3 auf die pH-Sensibilität
und Pharmakologie des Kaliumkanals hKCNQ1**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Viktoria Koren

2009

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Richard Warth
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernhard Banas
Tag der mündlichen Prüfung:	20.10.2009

meinen Eltern

1. EINLEITUNG	6
1.1 Eigenschaften von KCNQ1 und KCNEs.....	6
α -Untereinheit KCNQ1	6
KCNE- β -Untereinheiten.....	7
1.2 Zielsetzung der Arbeit	14
2. MATERIALIEN UND METHODEN	15
2.1 Vorgehensweise.....	15
2.2 Heterologe Expression in COS-7- und CHO-K1-Zellen.....	15
2.3 Elektrophysiologische Untersuchungen	17
2.4 Fluoreszenzmessungen des intrazellulären pH-Wertes	22
2.5 Herstellung von Chimären	24
2.6 Lösungen und Substanzen	25
Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.....	25
Einsatz des membrangängigen Puffersystems Acetat/Essigsäure.....	25
2.7 Auswertung und Statistik	26
Verwendete Funktionen für die Beschreibung von Kurven	26
Statistik.....	28
3. ERGEBNISSE.....	29
3.1 pH-Regulation der homo- und heteromeren KCNQ1-Kanäle.....	29
Hemmung des KCNQ1-Kanals durch sauren pH.....	29
pH-induzierte Transformation der KCNQ1/KCNE1-Kinetik	31
Einfluss von pH auf den KCNQ1/KCNE2-Strom.....	36
pH-Unempfindlichkeit durch Assoziation von KCNE3 mit KCNQ1	37
Beeinflussung des zytosolischen pH-Wertes durch extrazelluläre pH-Veränderungen und 20 mM Acetatlösung	37
3.2 Analyse der KCNE2-pH-Regulation mit Hilfe von Chimären.....	38
3.3 Wirkung von pH 5,5 auf die „gain-of-function“-Mutante R27C-KCNE2.....	40
3.4 Pharmakologische Untersuchungen an KCNQ1/KCNE_x-Kanälen	41
Wirkung des klassischen KCNQ1-Inhibitors 293B	41
Wirkung von IKs124	42
Wirkung von IKs125	42
Wirkung von HMR1556.....	43

4. DISKUSSION	44
4.1 Untersuchungen von Kanälen in Expressionssystemen.....	44
4.2 Gewebespezifische Modulation der KCNQ1-Kanäle durch akzessorische β-Untereinheiten.....	45
4.3 pH-Regulation durch KCNE-Untereinheiten.....	46
Homomere KCNQ1-Kanäle	46
Konversion des KCNQ1/KCNE1-Stromes durch sauren pH.....	47
KCNE2 im Dienste der gastralen Salzsäureproduktion	49
Keine pH-Regulation bei KCNE3	50
4.4 Mechanismus der pH-Regulation	50
Direkter oder indirekter Effekt	50
Stöchiometrie der Untereinheiten.....	51
Rolle des extrazellulären N-Terminus.....	51
Bedeutung einzelner Aminosäuren.....	52
4.5 Untereinheitenspezifische Pharmakologie der heteromeren KCNQ1-Kanäle.	53
KCNE-vermittelte Änderung der Empfindlichkeit für Pharmaka.....	53
Chancen und Risiken der Anwendung der Kanalblocker.....	53
4.6 Resümee.....	54
5. ZUSAMMENFASSUNG	55
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	56
7. DANKSAGUNG	59
8. PUBLIKATIONEN.....	60
 Anhang I: Verwendete Abkürzungen.....	61
Anhang II: Bezugsquellen von verwendeten Geräten und Materialien.....	63
Anhang III: Verwendete Chemikalien.....	64
Anhang IV: Lebenslauf	67

1. Einleitung

1.1 Eigenschaften von KCNQ1 und KCNEs

α -Untereinheit KCNQ1

Auf der Suche nach einem mutierten Gen, das die hereditäre Herzerkrankung Long-QT-Syndrom 1 (LQT1) verursacht, wurde 1996 mittels Positionsklonierung der Kaliumkanal KCNQ1 entdeckt [42] und zunächst als KvLQT1 bezeichnet. Kv steht für die Klasse spannungsabhängiger (voltage gated) Kaliumkanäle, denn wie alle Vertreter dieser größten Familie der Kaliumkanäle zeigt KCNQ1 den typischen Aufbau aus sechs transmembranären Domänen, einer Porenregion zwischen Segment fünf und sechs und einem durch Argininreste positiv geladenen vierten Segment, welches wahrscheinlich als Spannungssensor fungiert (Abb. 1). Wie alle Kv-Kanäle müssen sich KCNQ1-Untereinheiten höchstwahrscheinlich tetramer zusammenlagern (Abb. 2 A), um Kaliumkanäle zu formen. Der Strom durch einen solchen homomultimeren KCNQ1-Kanal zeigt eine sigmoidale Spannungsabhängigkeit mit einer stärkeren Zunahme der Amplitude bei depolarisierteren Membranpotenzialen.

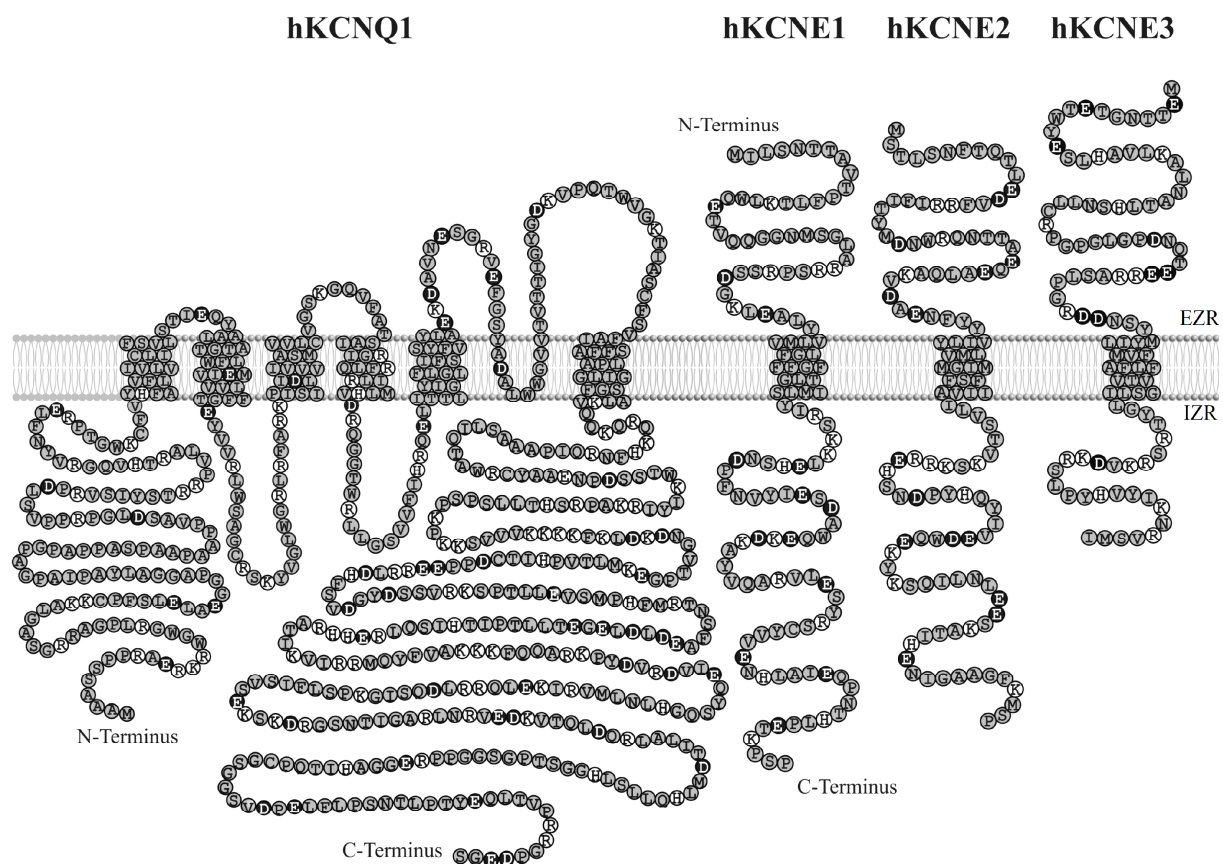


Abbildung 1: Putative Membrantopologie mit den Aminosäuresequenzen von KCNQ1 und KCNE1-3 im Einbuchstabenformat. Saure Aminosäuren sind weiß auf schwarzem Hintergrund dargestellt, basische genau umgekehrt. (EZR: Extrazellulärraum, IZR: Intrazellulärraum)

KCNE- β -Untereinheiten

Im Gewebe assoziiert KCNQ1 mit kleinen β -Untereinheiten, den so genannten KCNE-Proteinen, und formt heteromultimere Kanäle. Mittlerweile konnten fünf verschiedene KCNE-Proteine kloniert werden. Alle KCNE-Untereinheiten sind sehr klein und besitzen nur eine Transmembrandomäne, einen extrazellulären N- und einen zytosolischen C-Terminus, so dass sie alleine keinen Strom erzeugen können. Durch gewebespezifische Zusammenlagerung mit KCNQ1 (sog. α -Untereinheit) modulieren sie allerdings die biophysikalischen (Abb. 2 B), regulatorischen und pharmakologischen Eigenschaften des gesamten Kanals. In welchem stöchiometrischen Verhältnis die Assoziation erfolgt, ist bislang nicht bekannt. Möglicherweise werden jeweils zwei KCNE-Untereinheiten in ein KCNQ1-Tetramer integriert, wobei es ebenfalls nicht klar ist, ob sie an der Porenbildung beteiligt sind (Abb. 2 A) [23, 24, 35].

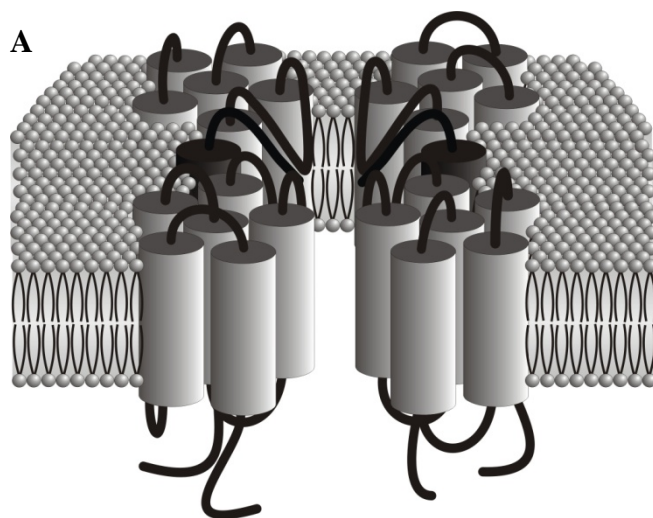


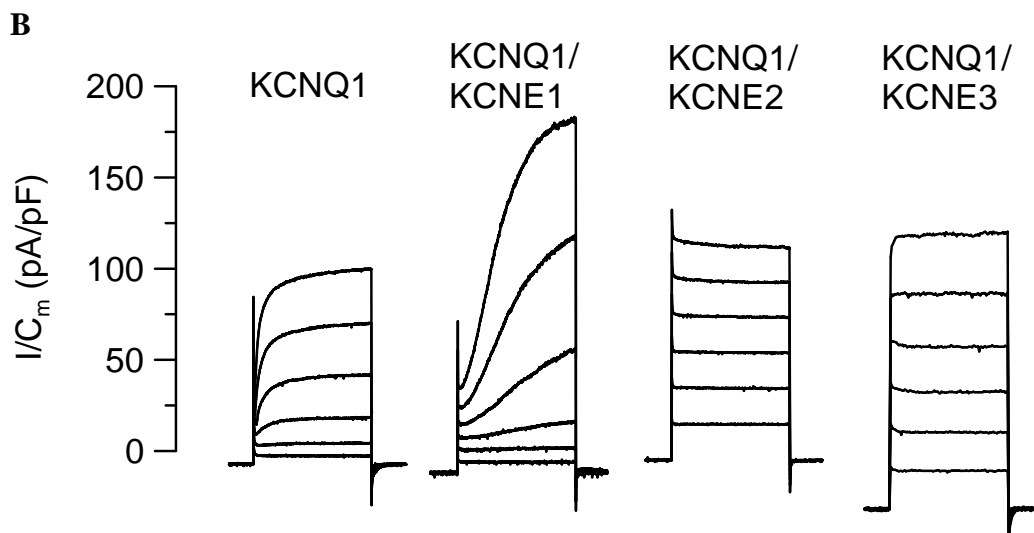
Abbildung 2:

A: Modell eines heteromeren KCNQ1-Kanals, bestehend aus vier KCNQ1- und zwei KCNE-Untereinheiten.

B: Übereinander projizierte Stromkurven bei sechs Klemmspannungen stellen die spezifische Regulation der Stromeigenschaften heteromerer KCNQ1-Kanäle durch KCNE-Proteine dar.

Ausgehend von -95 mV wurde die Zellmembran in 20 mV-Schritten für 2 s von -75 bis +25 mV geklemmt.

KCNQ1 alleine ist spannungsabhängig und langsam aktivierend. Durch Assoziation an KCNE1 wird dies verstärkt. Der Strom von KCNQ1/KCNE2 und KCNQ1/KCNE3 ist hingegen spannungsunabhängig und instantan.



KCNE1:

Interessanterweise wurde KCNE1 acht Jahre vor der Entdeckung von KCNQ1 kloniert [34]. Zunächst konnte man sich nicht erklären, wie ein derartig kleines Protein aus lediglich 129 Aminosäuren in *Xenopus laevis* Oozyten einen großen, spannungsabhängigen und sehr langsam aktivierenden Kaliumstrom induzierte, und warum dieser Strom in keinem anderen Expressionssystem beobachtet werden konnte. Die naheliegende Vermutung war, dass ein essentieller Kofaktor diesen Zellen fehlt. Das klonierte Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 21 (21q22.1-q22.2) erhielt den Namen minK (für „minimal K⁺ channel“).

1993 ist aufgefallen, dass der in *Xenopus laevis* Oozyten induzierte minK-Strom mit dem kardialen I_{Ks}-Strom in vielen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften übereinstimmt und wahrscheinlich diesem I_{Ks}-Strom zugrunde liegt.

Erst 1996 konnte nach der Klonierung von KCNQ1 gezeigt werden, dass minK, oder nach der neuen Nomenklatur KCNE1, nicht selbst einen Kaliumkanal bilden kann, sondern mit KCNQ1 assoziiert und einen heteromultimeren Kanal formt [3, 30]. Im Gegensatz zu den anderen verwendeten Expressionssystemen besitzen *Xenopus laevis* Oozyten einen endogenen xKCNQ1-Kanal, weshalb nur dort der I_{Ks}-artige Strom beobachtet werden konnte.

Der Kanalkomplex KCNQ1/KCNE1 wird sehr stark im Herzmuskel, im Innenohr, in der Niere und im Pankreas exprimiert.

In Herzmuskelzellen produzieren KCNQ1/KCNE1-Kanäle den sigmoidalen, zeitlich verzögerten, langsam aktivierenden I_{Ks}-Strom, der zusammen mit anderen Kaliumströmen an der Repolarisation der Kardiomyozyten nach einem Aktionspotenzial beteiligt ist (Abb. 3 A) [5, 16]. Mutationen im Gen für KCNQ1 oder KCNE1 können zu angeborenen Herzrhythmusstörungen führen, die klinisch durch ein verlängertes QT-Intervall im EKG auffallen und deshalb als Long-QT-Syndrom bezeichnet werden (Abb. 3 B) [32, 33]. Man unterscheidet das autosomal-dominant vererbte *Romano-Ward-Syndrom* und das autosomal-rezessiv vererbte *Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom* (JLNS). Beide Syndrome können – wenn auch nur selten – zu einer Torsade-de-pointes-Tachykardie (Abb. 4) (Frequenz von ca. 270/min, verbreiterte QRS-Komplexe, Veränderung der QRS-Amplitude infolge einer Umstellung der Herzachse), Kammerflimmern und zum plötzlichen Herztod führen. Ausgelöst werden die Rhythmusstörungen häufig durch körperliche Anstrengung oder Stress. Neben der Neigung zu Herzrhythmusstörungen leiden JLNS-Betroffene an angeborener bilateraler Taubheit, da KCNQ1/KCNE1 im Innenohr für die Produktion von Endolymphe notwendig ist.

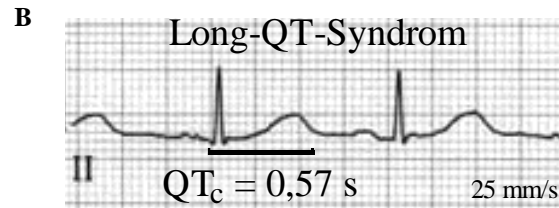
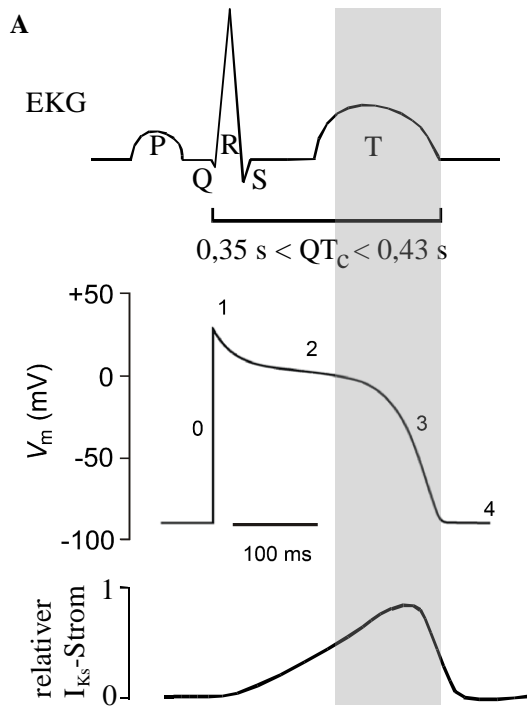


Abbildung 3:

Funktion des I_{Ks} -Stroms bei der elektrischen Aktivität des Herzmuskels.

A: Der I_{Ks} -Strom wird durch die Depolarisation der Membran langsam aktiviert und beschleunigt die Repolarisation der Kardiomyozyten in der dritten Phase des Aktionspotenzials.

B: Mutationen in den Genen für die dem I_{Ks} zugrunde liegenden Kaliumkanäle $KCNQ1/KCNE1$ verzögern die Repolarisation und verlängern dadurch das QT-Intervall im EKG. [47]

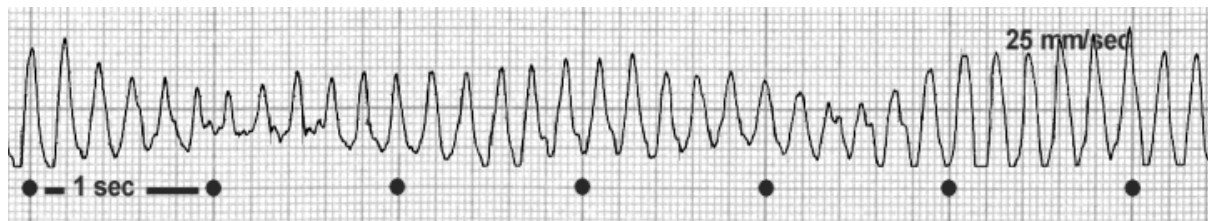


Abbildung 4: Typisches EKG-Bild einer Torsade-de-pointes-Tachykardie beim Long-QT-Syndrom. [48]

Sowohl in der Cochlea (Abb. 5) als auch im Gleichgewichtsorgan kann die Signalübertragung nur dann erfolgen, wenn die Flüssigkeit, die die Sinneszellen umgibt, die sogenannte Endolymphe, ca. 150 mmol/l Kalium enthält und auf etwa 80 mV positiv gegenüber der normalen extrazellulären Flüssigkeit (der Perilymphe) aufgeladen ist, da der Transduktionsvorgang durch Kaliumeinstrom in die Sinneszellen ausgelöst wird. Die Sekretion der Endolymphe erfolgt durch die Zellen der Stria vascularis in der Cochlea und durch die dunklen Zellen im Vestibularorgan, wobei der genaue Mechanismus noch nicht ganz geklärt ist. $\text{Na}^+-2\text{Cl}^--\text{K}^+$ -Symporter, H^+ -ATPase, KCNQ1/KCNE1 -Kaliumkanal, Barttin und Pendrin scheinen eine wichtige Rolle dabei zu spielen, da Mutationen in den kodierenden Genen die Endolymphproduktion stark beeinträchtigen [29, 43]. Im Gegensatz zu JLNS-Patienten, deren Innenohrsymptomatik auf bilaterale Taubheit weitgehend beschränkt ist, weisen KCNE1 -Knockoutmäuse zusätzlich ausgeprägte Gleichgewichtsstörungen auf, da ihnen anscheinend effektive Kompensationsmechanismen fehlen.

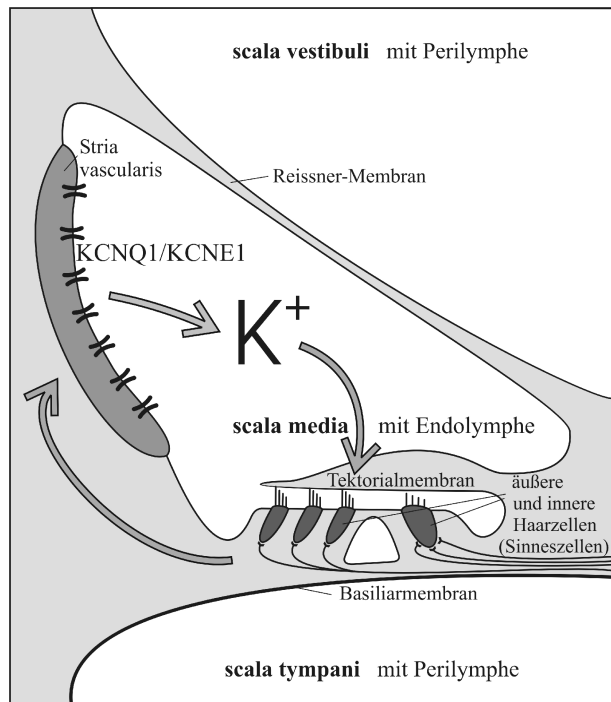


Abbildung 5:

Modell der cochleären Sekretion.

Die Endolympthproduktion erfolgt durch die Zellen der Stria vascularis, wobei luminale KCNQ1/KCNE1-Kanäle für die Kaliumsekretion essentiell sind. Im Rahmen des Schalltransduktionsvorganges strömen K^+ -Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten in die Sinneszellen ein und rezirkulieren über basolaterale Kanäle bzw. Transporter.

In der Niere wird KCNQ1/KCNE1 besonders intensiv im Bürstensaum des spätproximalen Tubulus exprimiert, um zusammen mit anderen Kaliumkanälen die luminale Membran zu hyperpolarisieren und dadurch die Triebkraft für alle an Na^+ -Einstrom gekoppelten, elektrogenen Resorptionsmechanismen aufrecht zu erhalten (Abb. 6) [40, 44]. Dies ist sehr wichtig für die Resorption von zahlreichen Stoffen wie beispielsweise Glukose und Aminosäuren. Ähnliche Aufgaben scheint KCNQ1/KCNE1 auch im Duodenum zu erfüllen.

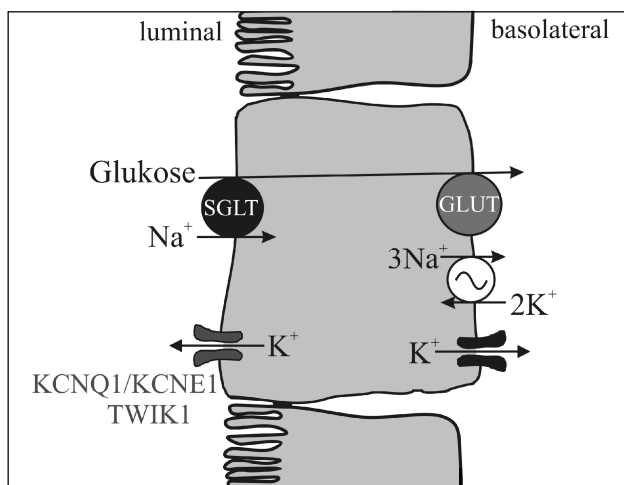


Abbildung 6:

Funktion von KCNQ1/KCNE1 im proximalen Tubulus.

Sekundäraktive Transportprozesse (z. B. an Na^+ -Einstrom gekoppelte Resorption von Glukose) depolarisieren die Bürstensaummembran. Luminale Kaliumkanäle wie TWIK1 und KCNQ1/KCNE1 hyperpolarisieren die Membran und unterstützen so den Transport.

Des Weiteren scheint KCNQ1/KCNE1 die Aldosteronsekretion in der zona glomerulosa der Nebennierenrinde zu regulieren. Die Funktion dieses Kanals im Pankreas, in den Speicheldrüsen, im Thymus, in den Hoden und in den Eierstöcken ist noch weitgehend unbekannt [44].

KCNE2:

Als 1999 das KCNE2-Gen auf dem Chromosom 21q22.1 kloniert und aufgrund 51% Homologie zu KCNE1 als MiRP (minK related protein) bezeichnet wurde, konnte damals in Koexpressionsexperimenten an *Xenopus laevis* Oozyten nur eine Assoziation mit HERG, einem anderen spannungsabhängigen Kaliumkanal, beobachtet werden, nicht aber mit KCNQ1 [1]. Erst ein Jahr später wurde gezeigt, dass in den aus Säugetierzellen entwickelten Expressionssystemen wie COS-, CHO- und HEK-Zellen sehr wohl eine Assoziation zwischen KCNQ1 und KCNE2 erfolgt, die zu dramatischen Veränderungen der Stromeigenschaften führt. KCNE2 transformiert den spannungsabhängigen, langsam aktivierenden KCNQ1-Strom zu einem völlig spannungsunabhängigen, instantanen Kaliumstrom [36]. Die Frage, warum in den Oozyten keine Koexpression gelingt, konnte allerdings bis heute nicht beantwortet werden.

Erst vor kurzem konnte KCNE2 als die gesuchte akzessorische β -Untereinheit des KCNQ1-Kanals in den Parietalzellen der Magenschleimhaut identifiziert werden [14, 20, 41]. Neben der Produktion des Intrinsic-Factors sezernieren die Parietalzellen (oder Belegzellen) die Salzsäure und senken dadurch den pH-Wert des Magensaftes auf 1 bis 2. Die Sekretion der Protonen erfolgt mittels einer H^+-K^+ -ATPase, einer Pumpe, die Protonen im Austausch gegen K^+ -Ionen unter ATP-Hydrolyse ins Lumen der Magendrüsen befördert. Damit die ohnehin kaliumarme extrazelluläre Flüssigkeit nicht noch mehr an Kalium verarmt und dadurch die Säureproduktion limitiert, müssen die aufgenommenen Kaliumionen die Zelle apikal wieder verlassen können. Für diese Rezirkulation stehen luminale Kaliumkanäle zur Verfügung, wobei KCNQ1 wahrscheinlich der wichtigste Vertreter ist, denn sowohl in vivo als auch in vitro hemmte der spezifische KCNQ1-Blocker 293B fast vollständig die Säuresekretion. Eine starke Beeinträchtigung der Säureproduktion, hohe Plasma-Gastrin-Konzentrationen und eine Hypertrophie der Magenschleimhaut bei KCNQ1-Knockoutmäusen verdeutlichen die Bedeutung dieses Kanals und das Fehlen ausreichender Kompensationsmöglichkeiten [8]. Allerdings gibt es Hinweise, dass homomere KCNQ1-Kanäle durch extrazellulären sauren pH deutlich gehemmt werden, was zusätzlich die Existenz eines Assoziationspartners fordert, der auch im äußerst sauren Milieu des Magenlumens eine ausreichende Leitfähigkeit des resultierenden Kanals gewährleistet. Es konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Koexpression von KCNE2 mit KCNQ1 sogar eine Aktivierung des Stromes während der extrazellulären Azidifizierung bewirkt. Von allen bekannten KCNE-Untereinheiten weist KCNE2 die stärkste Expressionsrate im Magen auf. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen

wurde eine Kolokalisation von KCNE2 mit KCNQ1 und eine partielle Kolokalisation mit der $H^+-K^+-ATPase$ in Parietalzellen beobachtet (Abb. 7). Im Gegensatz zur Protonenpumpe, die erst während der Stimulation der Säuresekretion von subapikalen Tubulovesikeln in die luminalen Membran eingebaut wird, scheinen KCNQ1-Kanäle ihre Lokalisation in der luminalen Membran auch ohne Stimulation beizubehalten [14].

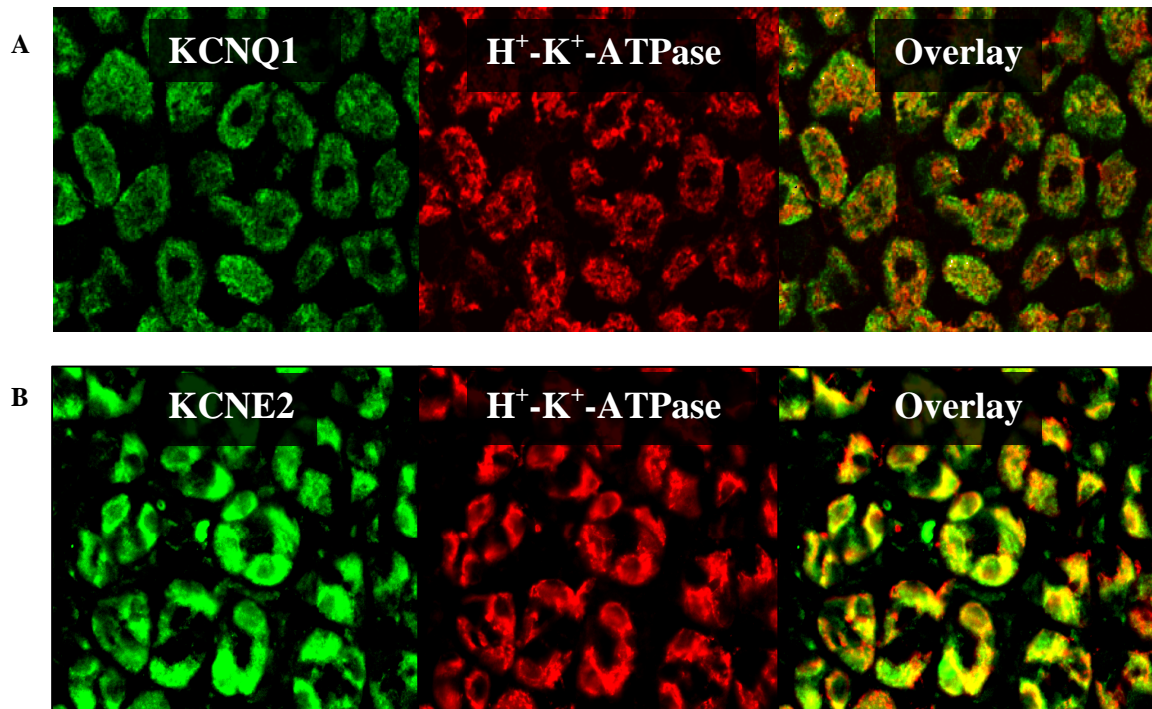


Abbildung 7: Immunfluoreszenzanalyse der Magenschleimhaut einer Ratte [14]. Kofärbungen mit Antikörpern gegen KCNQ1- und $H^+-K^+-ATPase$ (A), bzw. KCNE2- und $H^+-K^+-ATPase$ (B) zeigen eine deutliche Kolokalisation in den Parietalzellen.

Neben der hohen Expressionrate im Magen kommt KCNE2 auch in der Lunge, im Auge und im ZNS in nennenswerter Menge vor, wobei weder der Assoziationspartner noch die Funktion bekannt sind. Auch im Herzen wurde das KCNE2-Protein nachgewiesen, allerdings in einer relativ niedrigen Konzentration und wahrscheinlich als Untereinheit von KCNQ1 und vom HERG-Kaliumkanal (human ether-a-go-go-related gene), der dem I_{Kr} -Strom in der frühen Repolarisationsphase der Kardiomyozyten zugrunde liegt [4].

KCNE3:

KCNQ1 ist in Kolonkrypten basolateral exprimiert und in die NaCl-Sekretion involviert, indem er die elektrische Triebkraft für den luminalen Chloridausstrom bereitstellt [9, 10, 45]. Homomere KCNQ1-Kanäle müssten allerdings bei den dort herrschenden stark negativen Membranpotenzialen weitgehend inaktiv sein. 1999 wurde das 109 Aminosäuren lange KCNE3-Protein auf dem Chromosom 11q13-q14 kloniert [1] und konnte wenig später als Partner des KCNQ1-Kanals im Kolon identifiziert werden [31]. Ähnlich wie die KCNE2-Untereinheit übt KCNE3 einen dramatischen Effekt auf die biophysikalischen Eigenschaften des KCNQ1-Kanals aus. KCNE3 verwandelt KCNQ1 in einen konstitutiv offenen Kanal mit einem linearen Strom-Spannungsverhalten, so dass der Kanal auch bei deutlich negativen Membranpotenzialen aktiv ist und einen Kaliumstrom erzeugt. Dieser auswärts gerichtete Kaliumstrom verstärkt seinerseits die Hyperpolarisation der Membran und damit die Triebkraft für die elektrogene Chloridsekretion. Ähnlich wie in Kolonkrypten scheinen KCNQ1/KCNE3-Kanäle auch im Dünndarm, in der Trachea und in anderen NaCl-sezernierenden Epithelien in die Chloridsekretion involviert zu sein und könnten ein potentiellles Angriffsziel für neue Therapien bei der Cholera und anderen Formen der sekretorischen Diarrhoe sein [18, 19].



Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung der Kolonmukosa mit KCNQ1-Antikörpern (rot) zeigt die laterale Lokalisation der KCNQ1-Kanäle in Kolonkrypten.

KCNE4 und KCNE5:

Die 2003 klonierte KCNE4-Untereinheit [11, 12] mit dem Genort 2q35-q36 und das 1999 entdeckte x-chromosomale KCNE5-Protein [2] (Xq22.3) können ebenfalls mit KCNQ1 assoziieren, führen aber zu einer vollständigen Hemmung des Kaliumstroms im physiologisch relevanten Bereich. Erst bei stark depolarisierten Membranpotenzialen von ca. +100 mV lässt deren inhibitorische Wirkung nach und induziert einen KCNE1-ähnlichen Strom, daher wurde KCNE5 ursprünglich als „KCNE1-like protein“ (KCNE1-L) bezeichnet. Beide β -Untereinheiten werden im Herz- und Skelettmuskel, im Gehirn und in der Plazenta exprimiert, KCNE4 wurde außerdem in der Niere, in der Leber und in der Lunge detektiert. Trotz der relativ weiten Verbreitung im Körper ist ihre Bedeutung noch weitgehend ungeklärt. Neuere Untersuchungen weisen daraufhin, dass sie möglicherweise zusammen mit allen anderen KCNE-Untereinheiten den I_{Ks} -Strom im Herzen modulieren [4, 21].

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, in welcher Weise verschiedene KCNE- β -Untereinheiten die Funktion und Pharmakologie des KCNQ1-Kaliumkanals beeinflussen. Im Einzelnen wurden folgende Fragen bearbeitet:

- Welche Rolle spielen die KCNE-Untereinheiten bei der pH-Regulation heteromerer KCNQ1-Kanäle?
- Welche Domäne von KCNE2 vermittelt die Aktivierung durch extrazelluläre pH-Erniedrigung?
- Wie beeinflusst saurer pH die biophysikalischen Eigenschaften des kardialen Kanalkomplexes KCNQ1/KCNE1?
- Lassen sich KCNE-Untereinheiten-spezifische Hemmstoffe von KCNQ1 entwickeln?

2. Materialien und Methoden

2.1 Vorgehensweise

Um den Einfluss einzelner KCNE-Untereinheiten auf die biophysikalischen Eigenschaften heteromerer KCNQ1-Kanäle untersuchen zu können, wurden Säugerzellen mit den entsprechenden Plasmiden transient transfiziert und der resultierende Ionenstrom elektrophysiologisch mit Hilfe der patch-clamp-Technik (Saugelektrodenmethode) in Abhängigkeit von unterschiedlichen Umgebungsbedingungen gemessen. Durch Variationen des pH-Wertes der Badlösung und Einsatz des diffusiblen Puffersystems Acetat/Essigsäure konnten die Effekte der extrazellulären und zytosolischen pH-Veränderungen analysiert werden. Zur Untersuchung des molekularen Mechanismus der bereits bekannten Säureaktivierung des KCNQ1/KCNE2-Kanals wurden Chimären aus KCNE2 und KCNE3 konstruiert, mit dem Ziel, einen putativen pH-Sensor möglichst genau zu lokalisieren.

Die pharmakologischen Studien erfolgten ähnlich wie die Untersuchungen der pH-Regulation, mit dem Unterschied, dass nicht der pH-Wert der Badlösung verändert, sondern die Konzentration des jeweiligen Hemmstoffes von 10^{-10} bis 10^{-6} mol/l variiert wurde.

2.2 Heterologe Expression in COS-7- und CHO-K1-Zellen

Als Expressionssystem¹⁾ wurden COS-7-Zellen, eine Nierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze *Cercopithecus aethiops*, und CHO-K1-Zellen (chinese hamster ovary cells), die dem Ovar des chinesischen Hamsters *Cricetus griseus* entstammen, verwendet.

Beide Zelllinien wuchsen bei 37°C und 5% CO₂ in Kunststoffschälchen²⁾ mit einem Durchmesser von 10 cm. Das D-MEM Medium³⁾ für die COS-Zellen wurde mit fetalem Kälberserum³⁾ (100 g/l), L-Glutamin (0,073 g/l), Na-Pyruvat (1 g/l), Penicillin (50 IE/ml) und Streptomycin (0,05 g/l) angereichert. Dem MEM α Medium³⁾ der CHO-Zellen wurde ebenfalls fetales Kälberserum (80 g/l), Penicillin (50 IE/ml) und Streptomycin (0,05 g/l) zugesetzt.

Die hochgestellten Zahlen 1) bis 26) beziehen sich auf die im Anhang II (Seite 63) aufgelisteten Bezugsquellen von verwendeten Geräten und Materialien.

Sobald die Zellen den Boden der Schälchen konfluent bedeckten, wurden sie mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA) von der Unterlage abgelöst und entweder weiterkultiviert oder auf Deckglasplättchen⁴⁾ in 3,5 cm Schälchen ausgesät, transient transfiziert und nach 48 Stunden für die patch-clamp-Experimente verwendet.

Für die Transfektion wurden die humanen KCNE-Untereinheiten 1 bis 3 sowie alle Chimären in den Expressionsvektor pIRES-CD8 kloniert [6], um erfolgreich transfizierte Zellen an der Beladung mit Anti-CD8-Kügelchen (Dynabeads M-450 CD8)⁵⁾ erkennen zu können (Abb. 9). Die ebenfalls humane KCNQ1-DNA war im pCI-Plasmid kodiert und wurde zur Kotransfektion mit den KCNE-Untereinheiten verwendet. Für die Expression homomerer KCNQ1- oder heteromerer KCNQ1/R27C-KCNE2-Kanäle stand der pIRES-CD8-KCNQ1-Vektor zur Verfügung.

Die cDNA der R27C-Mutante von KCNE2 befand sich im pXOOM-Plasmid, so dass deren Expression an das fluoreszierende EGFP-Protein gekoppelt war und mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden konnte.

Pro Schälchen wurden 0,6 µg pCI-KCNQ1, 0,8 µg pIRES-CD8-KCNEx und 3 µl FuGENE⁶⁾ als Transfektionsreagenz eingesetzt. Die Expression aller Vektoren erfolgte unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

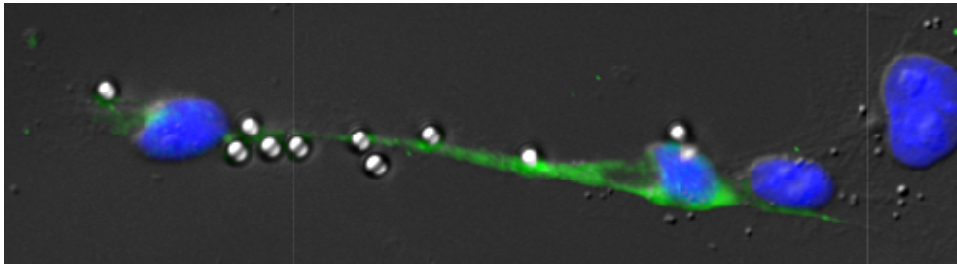


Abbildung 9: Erfolgreich transfizierte Zellen.

Die KCNQ1-Immunfärbung (grün) weist die KCNQ1-Expression nach. Die Beladung mit Dynabeads zeigt, dass dieselbe Zelle auch das pIRES-CD8-Plasmids mit einer KCNE-Untereinheit exprimiert. Die Kerne wurden mit HOE33342 (blau) gefärbt.

2.3 Elektrophysiologische Untersuchungen

1976 beschrieben Erwin Neher und Bert Sakmann zum ersten Mal die so genannte „patch-clamp“- oder Saugelektrodenmethode [25, 26], mit der winzige Ionenströme durch einzelne Ionenkanäle registriert werden können. Für die Entwicklung dieser Technologie wurden die beiden deutschen Forscher 1991 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet, da ihre Erfindung die moderne Elektrophysiologie erst möglich gemacht hat.

In dieser Arbeit wurde zum größten Teil eine Variante der Methode, die Ganzzelleableitung (whole-cell-configuration), verwendet, mit der die Ionenströme einer ganzen Zelle gemessen werden können [13].

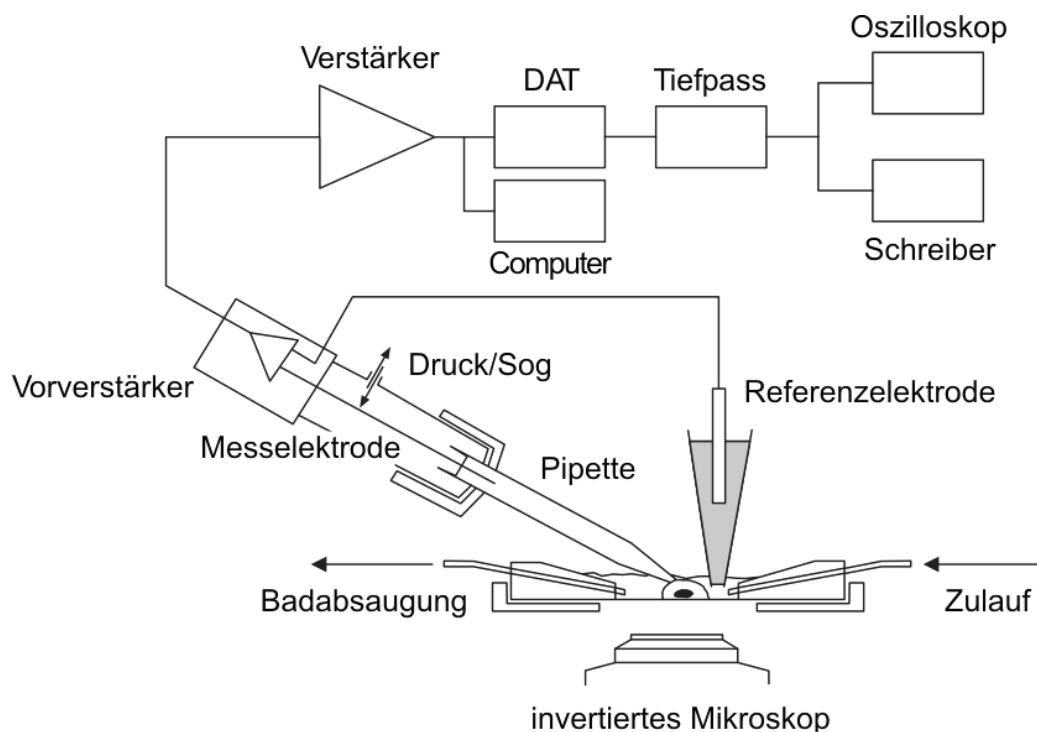


Abbildung 10: Versuchsaufbau für patch-clamp-Untersuchungen. Erläuterungen siehe Text.

Für die Experimente mussten sehr feine Glaspipetten hergestellt werden. Dazu wurden Borosilikatglaskapillaren⁷⁾ mit einem Ziehgerät⁸⁾ erhitzt und zu Pipetten mit einem Spitzendurchmesser von 1-3 μm ausgezogen. Da das Pipetteninnere während der Ganzzelleableitung mit dem Zytosol der Zelle direkt verbunden ist, wurde die ionale Zusammensetzung der Pipettenlösung (siehe Tabelle 1) so gewählt, dass sie weitgehend den Verhältnissen in der Zelle entsprach. Die mit der Elektrolytlösung gefüllten Pipetten (3-5 $\text{M}\Omega$ Widerstand) wurden auf eine Ag/AgCl-Messelektrode gesteckt, am Pipettenhalter⁹⁾ befestigt und in das Bad eingebracht, das auf einem beweglichen Objektisch des inversen Mikroskops^{10, 11)} fixiert war.

Der Badboden wurde durch ein Glasplättchen gebildet, auf dem die Zellen wuchsen, und mit Silikonfett¹²⁾ am Bad festgeklebt. Das Bad hatte ein Volumen von 0,5-1 ml und war mit der Badlösung gefüllt, deren Ionenzusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit entsprach (Kontrolllösung, Tabelle 2), wobei sie durch den Zulauf mit einer Flussrate von 20-30 ml/min ausgetauscht werden konnte. Im Bad befand sich außerdem eine zweite Elektrode, die Referenzelektrode, die mit 1-molarer KCl-Lösung gefüllt war.

Wenn sich die Referenzelektrode und die Glaspipette mit der Ag/AgCl-Messelektrode im Bad befinden, ist der Stromkreis geschlossen, und man misst eine annähernd konstante Spannungsabweichung von Null, die ein Summenpotenzial aus folgenden vier Potenzialen darstellt:

1. Elektrodenpotenzial (E1) zwischen Ag/AgCl-Messelektrode und der Pipettenlösung (Pip)
2. Elektrodenpotenzial (E2) zwischen Referenzelektrodenlösung (Ref) und der Ag/AgCl-Referenzelektrode
3. Grenzflächenpotenzial (E3) zwischen Pipetten- und Badlösung (Bad)
4. Grenzflächenpotenzial (E4) zwischen Bad- und Referenzelektrodenlösung

Im Gegensatz zu den Elektrodenpotenzialen (E1 und E2), die während des Experiments konstant bleiben, können sich die Grenzflächenpotenziale bei Lösungswechsel ändern. Mit Hilfe der Goldmann-Hodgkin-Katz-Gleichung lassen sie sich berechnen, wenn die Konzentrationen und die Mobilitäten (m) der relevanten Ionen bekannt sind. Für das Potenzial E3 zwischen Pipettenlösung und Badlösung ergibt sich bei Verwendung der Standardlösungen (siehe Tabelle 1):

$$E_3 = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{m_{Na^+} [Na^+]_{Bad} + m_{K^+} [K^+]_{Bad} + m_{Cl^-} [Cl^-]_{Pip} + m_{Glu^-} [Glu^-]_{Pip}}{m_{Na^+} [Na^+]_{Pip} + m_{K^+} [K^+]_{Pip} + m_{Cl^-} [Cl^-]_{Bad} + m_{Glu^-} [Glu^-]_{Bad}} \approx -9,88 \text{ mV}$$

Dabei steht R für die allgemeine Gaskonstante, T für die Temperatur (K), F für die Faraday-Konstante und Glu für Glukonat. Für die einzelnen Ionen wurden folgende relative Mobilitäten zugrunde gelegt:

$$m_{Na^+} = 0,6688; m_{K^+} = 0,9552; m_{Cl^-} = 1,0; m_{Glu^-} \approx 0,5$$

Allerdings existiert das Grenzflächenpotenzial nur, solange Pipettenlösung und Badlösung direkt miteinander in Verbindung stehen, d.h. bevor die Pipette auf die Zellmembran aufgesetzt wird.

Nach der Positionierung der Pipette im Bad wird die Pipettenspitze mit Hilfe eines Mikromanipulators⁸⁾ unter Beobachtung mit einem invertierten Mikroskop mit DIC-Optik bei 400facher Vergrößerung auf die Oberfläche einer Zelle gebracht. Durch vorsichtiges Erzeugen eines leichten Unterdruckes in der Pipette wird ein kleines Areal (patch) der Zellmembran in die Pipettenöffnung hineingesaugt. Durch Interaktion der Glasoberfläche mit der Membran bildet sich ein sehr hoher elektrischer Abdichtwiderstand (R_s) von 1-100 G Ω aus (Gigaseal), dessen Größe mit Hilfe einer zwischen der Messelektrode und der Referenzelektrode angelegten Rechteckspannung und des resultierenden Stromes analysiert werden konnte. Nach der Sealbildung existiert das Grenzflächenpotenzial E3 praktisch nicht mehr, so dass die Nullposition der Spannungsspur auf dem Schreiberpapier um diesen Betrag korrigiert wurde.

Um das Grenzflächenpotenzial E4 zwischen Bad- und Referenzelektrodenlösung möglichst konstant zu halten, wurde als Referenzelektrodenlösung eine 1 M KCl-Lösung gewählt, da durch die hohe Elektrolytkonzentration sowohl der Zähler als auch der Nenner (siehe Gleichung) von der Referenzelektrodenlösung bestimmt werden, so dass Änderungen der ionalen Zusammensetzung der Badlösung nur einen vernachlässigbaren Einfluss auf das gemessene Potenzial ausüben.

Nach der Ausbildung des Gigaseals wurde die Pipettenkapazität C_p mit dem C_{fast} -Schaltkreis des Verstärkers¹³⁾ kompensiert, indem die Amplitude einer überlagerten sinusförmigen Wechselspannung (800 Hz) minimiert wurde.

Das enge Anliegen der Zellmembran an die Pipette ermöglichte das Einreißen des Membranflecks unter der Pipette durch plötzliche Erhöhung des Unterdruckes, so dass die Pipettenlösung direkt mit dem Zellinneren verbunden war, ohne die elektrische Abdichtung zum Bad zu beeinträchtigen. Da das Pipettenvolumen sehr viel größer ist als das Zellvolumen, wurde die intrazelluläre Flüssigkeit relativ rasch durch Dialyse der Zusammensetzung der Pipettenlösung angeglichen. Dadurch konnte die Ionenzusammensetzung auf beiden Seiten der Zellmembran gut definiert und kontrolliert bzw. die Nernst-Potenziale für die einzelnen Ionen berechnet werden. Diese Standardmessanordnung wird als Ganzzellableitung (whole-cell-configuration) bezeichnet, da auf diese Weise Ströme durch die Zellmembran der ganzen Zelle gemessen werden können. Zunächst müssen allerdings die Zugangsleitfähigkeit G_a und die Kapazität der Zellmembran C_m mit den G_{series} - und C_{slow} -Schaltkreisen des Verstärkers, ebenfalls mit Hilfe der überlagerten Sinusspannung, abgeglichen bzw. bestimmt werden.

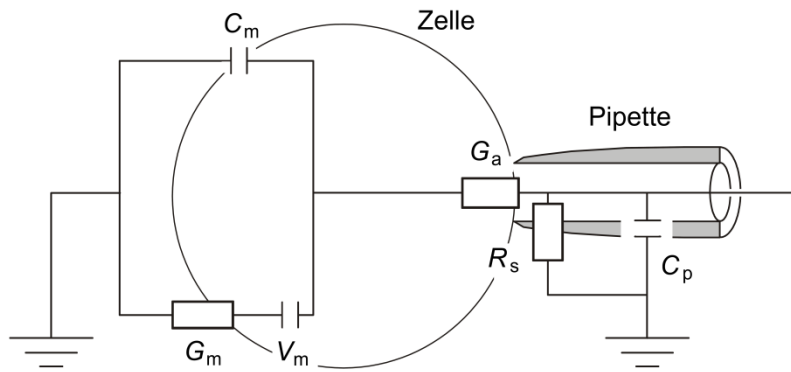


Abbildung 11:

Schaltbild der Ganzzellableitung.

C_m = Membrankapazität
 V_m = Membranpotenzial
 G_m = Membranleitfähigkeit
 G_a = Zugangsleitfähigkeit
 R_s = Abdichtwiderstand
 C_p = Pipettenkapazität

Der Nachteil dieses Messsystems besteht darin, dass man nicht sicher ermitteln kann, ob die beobachteten Effekte auf Ionenkanäle direkter Natur sind oder über noch erhaltene intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst bzw. beeinflusst werden, da ja die Zelle als Ganzes vorliegt. Aus diesem Grund wurden einige Experimente in der so genannten „outside-out“-Konfiguration durchgeführt, bei der nur ein kleiner Membranfleck praktisch zytosolfrei untersucht wird. Um diese Modifikation zu erreichen, wird die Pipette nach der Herstellung der Ganzzellkonfiguration vorsichtig und sehr langsam mit Hilfe eines Mikromanipulators senkrecht von der Zelle weggefahren, bis sich in der Pipette durch Abschnürung ein kleines Membransäckchen gebildet hat (Abb. 12). Die Außenseite der Membran steht immer noch mit der Badlösung und die Innenseite mit der Pipettenflüssigkeit in Kontakt, so dass die Stromrichtung unverändert geblieben ist.

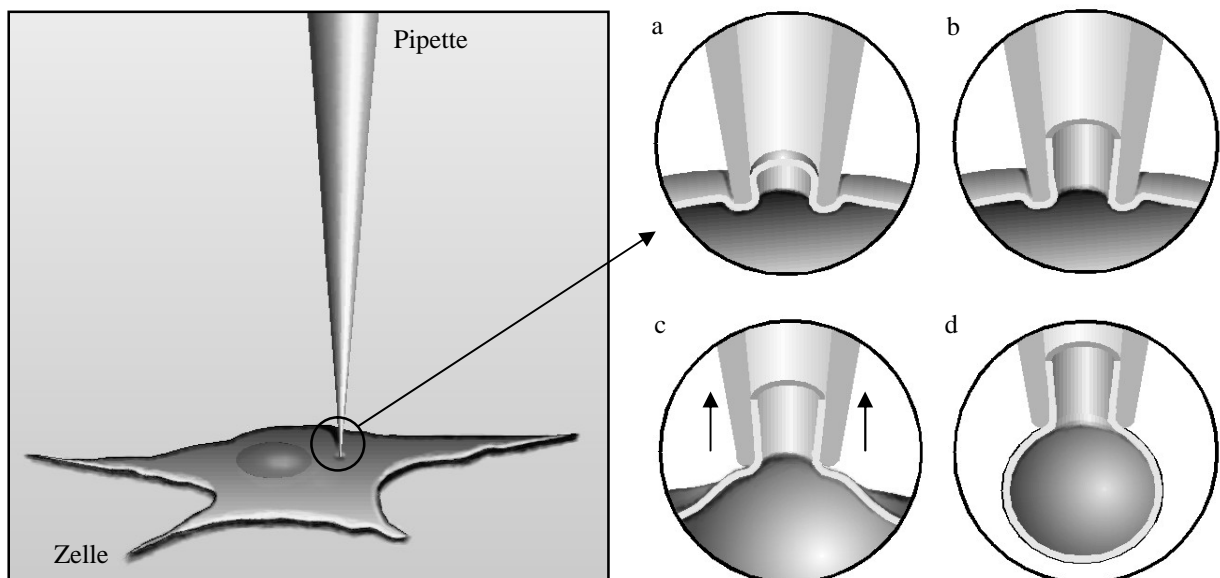


Abbildung 12: Übergang von der Ganzzellableitung in die outside-out-Konfiguration.

Nach der Sealbildung (a) wird der Sog weiter erhöht, bis die Membran einreißt und die Ganzzellableitung entsteht (b). Durch vorsichtiges Wegfahren der Pipette (c) wird die outside-out-Konfiguration erreicht (d). (Erläuterungen siehe Text)

Für die Experimente wurden insgesamt zwei ähnliche Spannungsklemmprotokolle verwendet. Um vollständige Stromspannungskurven zu ermitteln, wurden in den meisten Experimenten die Zellen für je 1 s von einem Potenzial von -95 mV in 20 mV-Schritten bis maximal + 25 mV depolarisiert, wobei zwischen den Klemmschritten die Zellmembran für jeweils 1 s wieder bei -95 mV gehalten wurde. In Experimenten an Kanälen, die eine langsame Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik zeigen, wurde die Dauer der einzelnen Klemmschritte auf 2 s ausgedehnt. Ansonsten wurde dasselbe Klemmprotokoll bis zum Schritt bei +25 mV beibehalten und unmittelbar danach für 5 s auf -55 mV geklemmt, um die Deaktivierung darzustellen.

Mit dem Verstärker konnte sowohl das Membranpotenzial V_m als auch der Strom I_m durch die Zellmembran in Abhängigkeit von der geklemmten Spannung registriert werden. Die elektrischen Signale des Vorverstärkers wurden über den Verstärker zum DAT-Rekorder¹⁴⁾ und zu Computer geleitet, wobei als Software das Programm F-Patch¹⁵⁾ diente. Nach Tiefpassfilterung mit 1000 Hz mit einem Besselfilter¹⁶⁾ wurden die Signale auf einem Speicheroszilloskop¹⁷⁾ und einem Schreiber¹⁸⁾ dargestellt. Alle Geräte und der Faradaykäfig⁸⁾, der den Messplatz gegen elektromagnetische Wellen abschirmte, waren auf einen Punkt geerdet. Das Mikroskop und der Manipulator waren auf einem schwingungsgedämpften Tisch gelagert, um Erschütterungen des Untergrundes nicht auf Bad und Pipette zu übertragen.

Bei der Auswertung der Experimente sollte berücksichtigt werden, dass der Strom von der Menge der exprimierten Kanäle, und diese wiederum von der Zellgröße abhängt. Da die Zelloberfläche direkt proportional zu der Membrankapazität ist, wobei $1 \mu\text{m}^2$ ca. 1 pF entspricht, wurden die gemessenen Ganzzellströme auf die Kapazitäten der jeweiligen Zellen bezogen und in pA/pF angegeben. Auf diese Weise konnte vermieden werden, dass größere Zellen bei der Mittelwertbildung mehr ins Gewicht fallen. Auch die Streuung der Messergebnisse konnte durch diese Normierung reduziert werden.

2.4 Fluoreszenzmessungen des intrazellulären pH-Wertes

Die Messung des intrazellulären pH-Wertes erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF, das seine Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit vom pH ändert [38]. Während das Anregungsmaximum bei 503 nm sowie das Emissionsmaximum bei 525 nm konstant bleiben, steigen mit zunehmendem pH die entsprechenden Anregungs- bzw. Emissionsintensitäten. Nur bei 436 nm ist die Fluoreszenzintensität vom pH unabhängig, daher wird diese Wellenlänge als der isosbestische Punkt des BCECF bezeichnet.

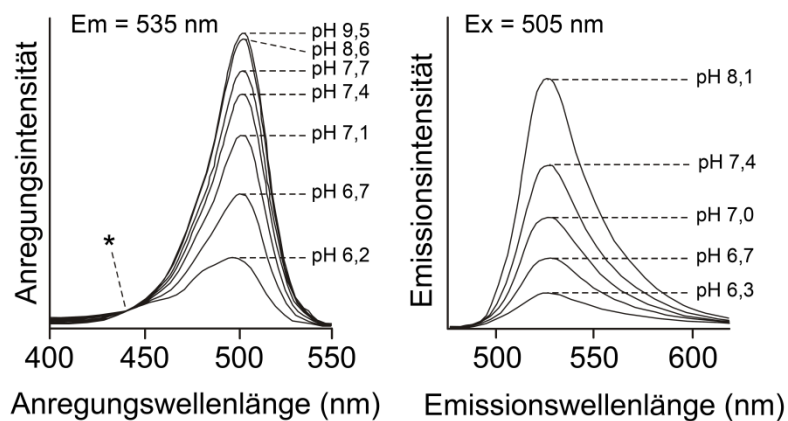


Abbildung 13: Anregungs- und Emissionsspektrum von BCECF.
(* = isosbestischer Punkt)

Für die Messung müssen die zu untersuchenden Zellen mit BCECF beladen werden. Dazu wurden Deckgläschen mit COS-7- bzw. CHO-K1-Zellen genau wie bei den elektrophysiologischen Messungen mit Silikonfett an der Unterseite der Badkammer befestigt und kurz mit der Kontrolllösung gespült, um Reste des Kulturmediums zu entfernen. Anschließend fand die ca. 30-minütige Inkubationsphase mit BCECF statt, wobei der Acetoxymethylester des BCECF (BCECF/AM) in einer Konzentration von 30 μ M verwendet wurde. Durch die Veresterung aller hydrophilen Carboxylatgruppen mit Acetoxymethylresten wird die Passage der Zellmembran ermöglicht. Im Zytosol spalten dann unspezifische zelleigene Esterasen die Acetoxymethylester ab, so dass letztendlich freies, lipidunlösliches BCECF in der Zelle bleibt. Nach dem Beladungsvorgang wurde das Bad auf dem beweglichen Objektisch eines invertierten Fluoreszenzmikroskopes¹⁹⁾ fixiert und die Messung gestartet.

Ein gutes Maß für den intrazellulären pH-Wert liefert der Quotient aus den gemessenen Emissionsintensitäten bei einer Anregung mit Licht der Wellenlängen 488 nm und 436 nm, wobei eine Proportionalität zwischen dem Quotienten und dem pH-Wert vorliegt. Nimmt der

pH ab, so sinkt auch der Quotient, und umgekehrt weist eine Erhöhung des Quotienten auf eine Alkalinisierung der Zelle hin.

Während des Messvorganges wurde die raumtemperierte Badlösung kontinuierlich ausgetauscht. Das Licht für die Anregung stammte von einer Xenon-Kurzbogenlampe²⁰⁾. Der Strahl ließ sich vor der Messung durch eine Lichtklappe blockieren, um das Ausbleichen des Präparates zu verhindern. Der Lichtstrahl fiel auf ein Filterrad, das die Bandpassfilter²²⁾ für die Anregungswellenlängen 436 nm und 488 nm enthielt. An einem Farbteiler²³⁾ wurde das Anregungslicht < 510 nm reflektiert und durch das Objektiv mit 40facher Vergrößerung auf das Präparat gelenkt. Das emittierte Licht (500-570 nm) fiel wieder durch das Objektiv und konnte aufgrund der längeren Wellenlänge den Farbteiler durchdringen. Es passierte einen 520-560 nm Bandpassfilter und wurde zur gekühlten CCD-Kamera²⁴⁾ geleitet. Die Analyse erfolgte durch ein Computerprogramm²⁵⁾, das den 488/436 Fluoreszenzquotienten berechnete und die Daten graphisch darstellte.

Um die gemessenen Fluoreszenzänderungen in pH-Einheiten angeben zu können, musste zunächst eine Eichkurve aus vorgegebenen pH-Werten und den entsprechenden Fluoreszenzquotienten erstellt werden. Da man den pH-Wert der Badlösung sehr einfach einstellen und regulieren kann, wurde mit Hilfe des K^+ - H^+ -Austauschers Nigericin (30 μ M) der intrazelluläre pH dem extrazellulären angeglichen. Die Eichlösungen enthielten 145 mM Kalium, damit der Protonentransport möglichst nur vom H^+ -Gradienten, nicht jedoch von den Kaliumkonzentrationen beeinflusst wurde. Im untersuchten pH-Bereich (6,0 bis 8,0) verlief die Eichkurve nahezu linear und konnte für die Umrechnung der gemessenen Veränderungen der Fluoreszenzquotienten 488/436 in pH-Einheiten verwendet werden.

2.5 Herstellung von Chimären

Für die Herstellung der Chimären aus hKCNE2 (Genebank Accession-Number: NM_172201) und hKCNE3 (NM_005472) wurden mit Pfu-Polymerase (Stratagene) und entsprechenden Primern (Tabelle 1) „blunt“-endende PCR-Fragmente synthetisiert. Nach Gelaufreinigung und Extraktion erfolgte der Restriktionsverdau der KCNE-Fragmente und des pIRES-CD8-Plasmids [6] mit EcoRI und BamHI. Anschließend wurden die Fragmente in das pIRES-CD8-Plasmid ligiert. Nach Transformation von kompetenten *E. coli*-Bakterien wurden die Plasmide isoliert und durch Sequenzierung kontrolliert.

Die Analyse der putativen Struktur der KCNE-Proteine im Hinblick auf die Lokalisation der Transmembrandomäne wurde mit dem Programm PredictProtein (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>) durchgeführt.

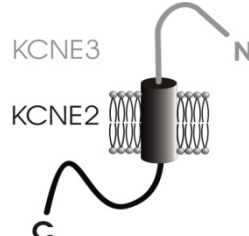
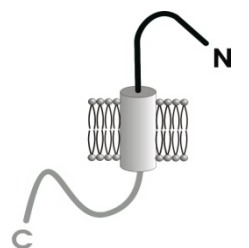
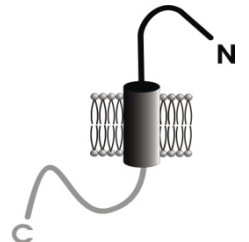
<p><u>E3N-E2TMC</u></p> 	<p>KCNE3-N-Terminus:</p> <p>sense CTATAGGGAGACCCAAGC</p> <p>antisense GTACATGTAGGAGTTGTCATC</p> <p>KCNE2-Transmembrandomäne-C-Terminus:</p> <p>sense GTCATCCTGTACCTCATGG</p> <p>antisense AGTACTCACCCCAACAGC</p>
<p><u>E2N-E3TMC</u></p> 	<p>KCNE2-N-Terminus:</p> <p>sense CTATAGGGAGACCCAAGC</p> <p>antisense ATAGTAGAAGTTCTCAGCATCA</p> <p>KCNE3-Transmembrandomäne-C-Terminus:</p> <p>sense ATTCTCTTTGTCATGTTTCTAT</p> <p>antisense AGTACTCACCCCAACAGC</p>
<p><u>E2NTM-E3C</u></p> 	<p>KCNE2-N-Terminus-Transmembrandomäne:</p> <p>sense ATAGCGGCCGCCAGTTCAATTACAGCTC</p> <p>antisense CACAGTGCTCACCAGG</p> <p>KCNE3-C-Terminus:</p> <p>sense CGCTCCCGCAAAGTGG</p> <p>antisense AGTACTCACCCCAACAGC</p>

Tabelle 1: Chimärenbezeichnung und Primer-Liste für die Chimärenkonstruktion.

Die R27C-hKCNE2-Mutante wurde uns freundlicherweise von unserem Kooperationspartner Dr. Jacques Barhanin (IMPC, CNRS, Sophia-Antipolis, Frankreich) zu Verfügung gestellt.

2.6 Lösungen und Substanzen

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, wobei die Konzentrationen in mmol/l angegeben sind. Die Bezugsquellen sind im Anhang III wiedergegeben. Die pH-Werte der Lösungen wurden täglich neu eingestellt.

	Pipettenlösung	Kontrolllösung	20 mM Acetat	Eichlösung K^+
NaCl		145	125	
K_2HPO_4		1,6	1,6	
KH_2PO_4		0,4	0,4	
Glucose	5	5	5	5
$MgCl_2$	2,38	1	1	1
$CaCl_2$		1,3	1,3	1,3
Hepes		5	5	10
K-Gluconat	95			
KCl	30			145
NaH_2PO_4	1,2			
Na_2HPO_4	4,8			
ATP Na_2	3			
cAMP	0,1			
Na-Acetat			20	
pH	7,2	4,0 bis 8,5	7,4	6,0 bis 8,0

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.

Die den zytosolischen Verhältnissen angenäherte Pipettenlösung wurde für Füllung der Glaspipetten bei patch-clamp-Experimenten verwendet. Als extrazelluläre Badlösung dienten die Kontrolllösung mit unterschiedlichen pH-Werten und die 20 mM Acetatlösung. Die Eichlösung mit 145 mM K^+ wurde zur Eichung des Fluoreszenzquotienten im Rahmen der Fluoreszenzmessung des intrazellulären pHs benutzt.

Einsatz des membrangängigen Puffersystems Acetat/Essigsäure

Um eine selektive zytosolische Azidifizierung der Zelle durchzuführen, wurde das membrangängige Puffersystem Acetat/Essigsäure verwendet. Das Prinzip dieser Ansäuerung besteht darin, dass die Essigsäure, nicht aber das geladene Acetat, die Zellmembran passieren kann und in der Zelle bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustands in Acetat und Protonen dissoziiert. Die erfolgte Deprotonierung bewirkt eine pH-Erniedrigung in der Zelle.

2.7 Auswertung und Statistik

Verwendete Funktionen für die Beschreibung von Kurven

Während der Strom durch KCNQ1/KCNE2 und KCNQ1/KCNE3 im physiologischen Bereich direkt proportional zur Klemmspannung ist und somit nur von der elektrochemischen Triebkraft abhängt, weisen homomere KCNQ1- und heteromere KCNQ1/KCNE1-Kanäle eine stark ausgeprägte Spannungsabhängigkeit auf. Diese äußert sich in einer exponentiellen Zunahme der Aktivierbarkeit bei positiveren Membranpotenzialen und einer Abflachung bei unphysiologisch hohen Werten. Um zu analysieren, ob und wie sich die Spannungsabhängigkeit je nach Umgebungsbedingungen verändert, wurde sie durch eine modifizierte Boltzmann-Funktion [7]

$$I_x = I_{\min} + \frac{I_{\max}}{1 + e^{(V_{1/2} - x)/k}}$$

beschrieben (Abb. 14 A), wobei I_{\min} und I_{\max} für den minimalen bzw. maximalen Strom stehen. $V_{1/2}$ ist die Spannung, bei der der Strom halbmaximal aktiviert wird. Mathematisch entspricht sie dem Wendepunkt des Graphen mit der definitionsgemäß größten Steigung, welche durch den Kehrwert des „slope factors“ k charakterisiert wird und ein Maß für die Steilheit bzw. für die Ausprägung der Spannungsabhängigkeit darstellt. Aufgrund der indirekten Proportionalität weist eine Erhöhung von k auf eine geringere Steigung mit einer Reduktion der Spannungsabhängigkeit hin.

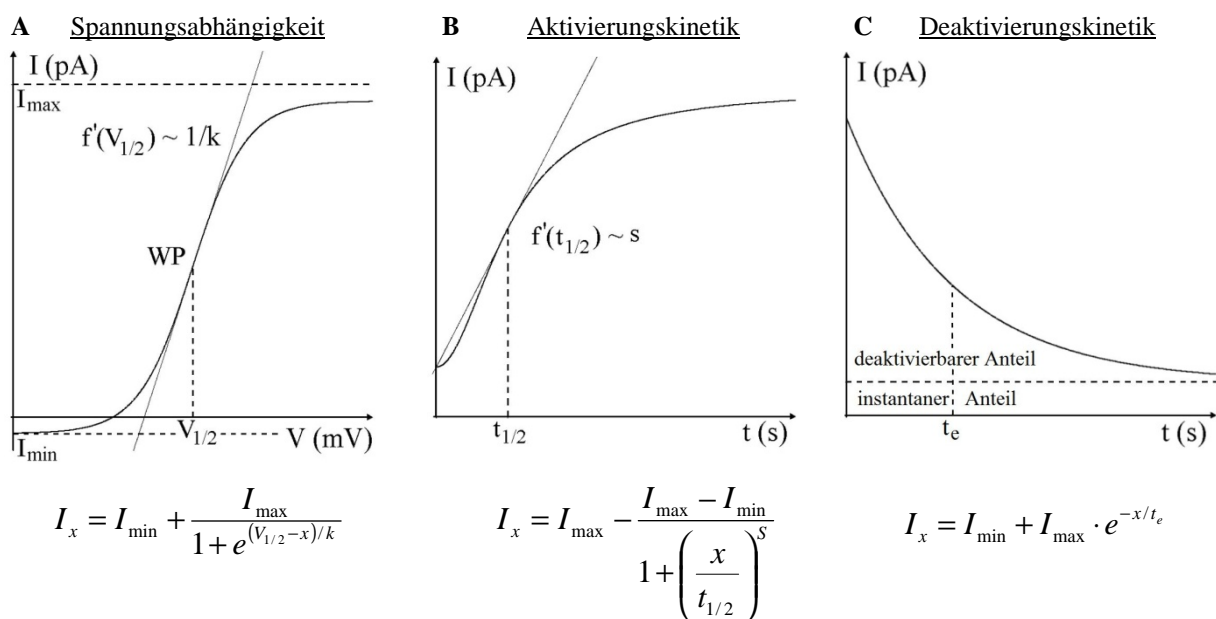


Abbildung 14: Verwendete Formeln für die Beschreibung der Stromeigenschaften homomerer KCNQ1- bzw. heteromerer KCNQ1/KCNE1-Kanäle.

Neben der charakteristischen Spannungsabhängigkeit besitzen homomere KCNQ1- und heteromere KCNE1/KCNQ1-Kanäle eine langsame Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik. Das bedeutet, dass die bei einer Klemmspannung maximal mögliche Amplitude nicht sofort – wie es bei KCNE2 und KCNE3 der Fall ist – erreicht wird, sondern erst nach einigen Sekunden.

Für die Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Aktivierung wurde eine Hill-Funktion verwendet (Abb. 14 B).

$$I_x = I_{\max} - \frac{I_{\max} - I_{\min}}{1 + \left(\frac{x}{t_{1/2}} \right)^s}$$

Neben den bekannten Parametern I_{\max} bzw. I_{\min} enthält sie die Halbaktivierungszeit $t_{1/2}$ und die dazu gehörige Konstante s als Maß für die Steilheit der Kurve. Zunahme von s bei unverändertem $t_{1/2}$ deutet darauf hin, dass in derselben Zeit höhere Stromamplituden erreicht werden, was nur bei einem Anstieg von I_{\max} möglich ist.

Mit Hilfe einer einfachen Exponentialfunktion ließ sich sehr gut die Deaktivierungskinetik beschreiben (Abb. 14 C).

$$I_x = I_{\min} + I_{\max} \cdot e^{-x/t_e}$$

Dabei steht t_e für die Deaktivierungskonstante, welche die Zeit angibt, in der die Stromamplitude um den Faktor e^{-1} – also um ca. 63% – gesunken ist.

Ähnlich wie die Aktivierungskinetik wurden Konzentrations-Wirkungskurven im Rahmen von pharmakologischen Untersuchungen inhibitorischer Substanzen mit folgender Funktion analysiert:

$$I_x = I_{\max} \cdot \frac{IC_{50}^n}{IC_{50}^n + x^n} + I_{\min}$$

Als wichtigstes Vergleichskriterium diente die halbmaximale Hemmkonzentration IC_{50} (inhibition concentration). Da die Aussage des Hill-Koeffizienten n in diesem Fall sehr schwer zu interpretieren ist, wurde auf dessen Deutung verzichtet. Der Parameter x steht für die Konzentration des Inhibitors.

Statistik

Die Versuchsergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) angegeben, wobei s_{n-1} die Standardabweichung der Stichprobe darstellt.

$$SEM = \frac{s_{n-1}}{\sqrt{n}}$$

Die Anzahl der in die Auswertung aufgenommenen Experimente n wird jedes Mal in Klammern angegeben. Um verschiedene Auswirkungen von Umgebungsbedingungen miteinander vergleichen zu können, wurden die meisten Versuche gepaart durchgeführt und mit dem zweiseitig gepaarten t-Test auf statistische Signifikanz hin untersucht. Dazu wurde die Testgröße t nach der Gleichung

$$t = \frac{|\bar{d}|}{SEM_d}$$

berechnet, wobei d für die Differenzen zwischen den gepaarten Beobachtungen steht. Da für t eine Student-t-Verteilung angenommen wurde, konnte die Irrtumswahrscheinlichkeit anhand der tabellierten Student-t-Verteilung bestimmt und zusammen mit der Anzahl der Experimente n in Klammern angegeben werden. Als statistisch signifikant wurden Ereignisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5\%$ ($p < 0,05$) betrachtet und mit einem Stern («) in den Grafiken markiert.

3. Ergebnisse

3.1 pH-Regulation der homo- und heteromeren KCNQ1-Kanäle

Hemmung des KCNQ1-Kanals durch sauren pH

Um zu analysieren, wie unterschiedliche β -Untereinheiten die pH-Sensibilität des KCNQ1-Kanals modulieren, wurde zunächst die pH-Regulation bei homomeren KCNQ1-Kanälen untersucht (Abb. 15). In Abwesenheit von den KCNE-Proteinen hatte eine auf pH 8,5 alkalisierte Badlösung keine Auswirkungen auf den KCNQ1-Strom. Extrazelluläre Azidifizierung hemmte den Strom von $52,6 \pm 9,0$ pA/pF auf $42,9 \pm 7,5$ pA/pF ($V_m=25$ mV, $n=10$, $p<0,01$), wobei diese Hemmung zum größten Teil durch eine Rechtsverschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zustande kam. So musste die Zellmembran unter Kontrollbedingungen auf $-7,98 \pm 2,50$ mV geklemmt werden, um eine halbmaximale Stromamplitude zu erhalten ($V_{1/2}$), während unter sauren Bedingungen das Potenzial $14,48 \pm 4,90$ mV betragen musste ($n=10$, $p<0,01$). Der „slope factor“ (k) blieb dagegen konstant ($28,47 \pm 2,36$ mV bzw. $28,52 \pm 2,91$ mV, $n=10$, $p=0,97$), was darauf hinweist, dass die Steilheit bzw. die Ausprägung der Spannungsabhängigkeit bei beiden pH-Werten gleich war. Da bei Veränderungen des extrazellulären pH-Wertes auch der zytosolische pH beeinflusst werden kann, wurde zusätzlich untersucht, was eine rein zytosolische Azidifizierung durch 20 mM Acetatlösung bewirkt. KCNQ1-transfizierte Zellen zeigten unter solchen Bedingungen eine schwache Hemmung der Stromamplitude von $60,7 \pm 24,6$ pA/pF auf $48,6 \pm 19,9$ pA/pF bei 25 mV Klemmspannung ($n=5$, $p=0,094$) und keine Veränderungen in der Spannungsabhängigkeit ($V_{1/2} = -0,40 \pm 6,56$ mV bzw. $-4,17 \pm 8,58$ mV, $n=5$, $p=0,30$; $k=25,76 \pm 3,16$ mV bzw. $26,93 \pm 3,36$ mV, $n=5$, $p=0,35$).

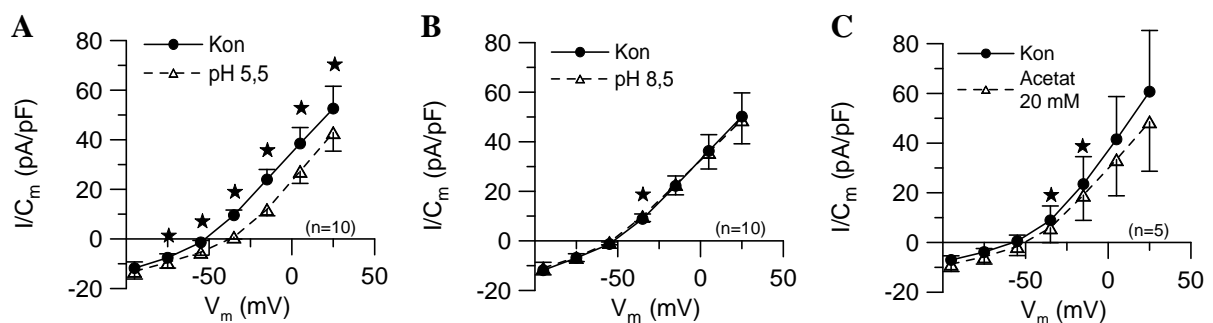


Abbildung 15: Wirkung verschiedener pH-Werte auf Ganzzellströme KCNQ1-transfizierter COS-7-Zellen in Abhängigkeit von der Klemmspannung.

A: Ansäuerung der Badlösung von pH 7,4 (Kon) auf pH 5,5 bewirkte eine Hemmung des Stromes.

B: Extrazelluläre Erhöhung des pH-Wertes auf 8,5 hatte keinen Effekt.

C: Zytosolische Azidifizierung durch 20 mM Acetatlösung hemmte den KCNQ1-Strom.

Sowohl die extra- als auch die intrazelluläre Erniedrigung des pH-Wertes verlangsamte außerdem die Deaktivierung der KCNQ1-Kanäle (Abb. 16). So wurde erst nach 0,6 bzw. 0,5 s eine 63 %-Deaktivierung erreicht, während unter Kontrollbedingungen nur 0,2 s vergingen. Im Gegensatz dazu beeinflusste nur die extrazelluläre Azidifizierung die Aktivierungskinetik von KCNQ1, was sich in einer Verlangsamung der Aktivierung äußerte.

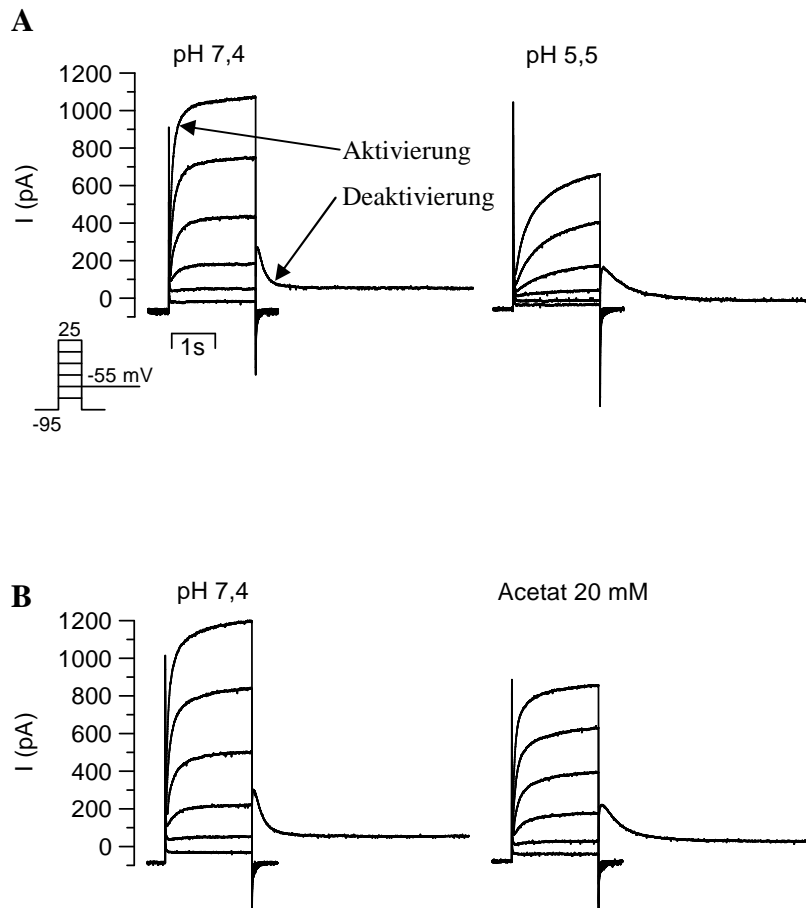


Abbildung 16:

Einfluss der extra- und intrazellulären Azidifizierung auf die Kinetik der homomeren KCNQ1-Kanäle. Übereinander projizierte Ganzzellströme eines repräsentativen Experimentes zeigen die Aktivierung und Deaktivierung in Abhängigkeit von der Zeit.

A: Ansäuerung der Badlösung auf pH 5,5 senkt die Stromamplitude und verlangsamt sowohl die Aktivierung als auch die Deaktivierung.

B: Neben der Verringerung der Stromamplitude verlangsamt die zytosolische Ansäuerung mit 20 mM Acetatlösung ebenso die Deaktivierung, ohne jedoch die Aktivierungskinetik zu beeinflussen.

pH-induzierte Transformation der KCNQ1/KCNE1-Kinetik

Assoziation mit KCNE1 führte zu einer Aktivierung des Gesamtstromes während der extrazellulären Azidifizierung auf pH 5,5 um ca. 20 %, verbunden mit einer deutlichen Verschiebung der Spannungsabhängigkeit zu hyperpolarisierteren Werten. Das mathematisch ermittelte Membranpotenzial ($V_{1/2}$), bei dem die halbmaximale Amplitude erreicht wurde, sank von $11,50 \pm 1,26$ mV auf $6,88 \pm 1,56$ mV ($n=13$, $p<0,01$). Neben dieser Linksverschiebung kam es zu einer Schwächung der Spannungsabhängigkeit, der „slope factor“ k stieg von $19,09 \pm 0,89$ mV auf $23,13 \pm 0,98$ mV ($n=13$, $p<0,01$) (Abb. 17 A). Wurde die Badlösung auf pH 8,5 alkalisiert, zeigten sich zum Teil umgekehrte Effekte. Die Amplitude nahm um ca. 12 % ab, $V_{1/2}$ wurde von $15,05 \pm 3,12$ mV zu $19,84 \pm 3,58$ mV verschoben ($n=11$, $p=0,03$), k blieb dagegen unverändert ($23,04 \pm 1,66$ mV bzw. $24,50 \pm 2,06$ mV, $n=11$, $p=0,14$) (Abb. 17 B).

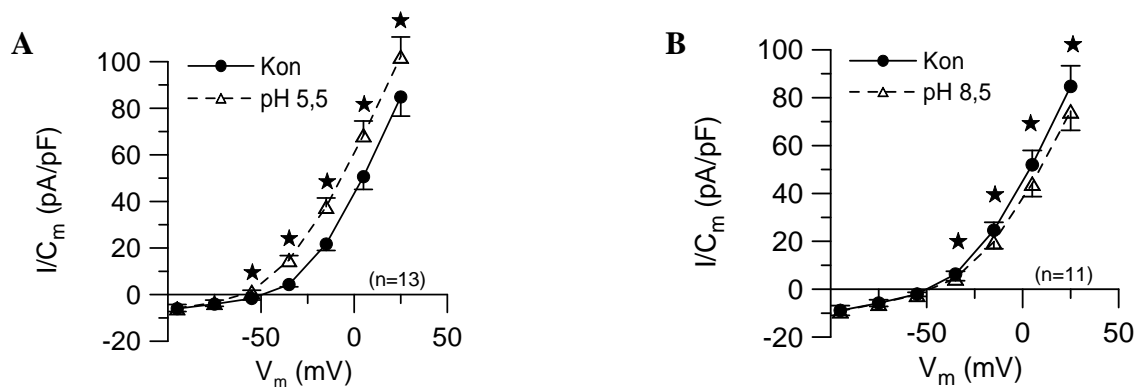


Abbildung 17: Modulation der Ganzzellströme KCNQ1/KCNE1-exprimierender COS-7-Zellen durch extrazellulären pH-Wert.

A: Erniedrigung des pH-Wertes der Badlösung auf 5,5 führte zu einer Aktivierung des Stromes.

B: Extrazelluläre Alkalinisierung hatte eine Hemmung des Stromes zur Folge.

Diese Befunde stehen in Widerspruch zu zwei Publikationen [7, 28], in denen eine Hemmung des KCNQ1/KCNE1-Stromes durch extrazellulären sauren pH beschrieben wurde. Allerdings haben diese Forscher im Gegensatz zu uns nicht COS-7-Zellen, sondern CHO-K1-Zellen und *Xenopus laevis* Oozyten als Expressionssystem verwendet. Um zu überprüfen, ob die pH-Regulation dieses Kanals vom gewählten Expressionssystem abhängt, wurden analoge patch-clamp-Experimente an KCNQ1/KCNE1-kotransfizierten CHO-K1-Zellen durchgeführt. Aber auch bei dieser Zelllinie beobachtete ich eine Säureaktivierung des KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexes mit einer Stromzunahme um etwa 39 %.

3. Ergebnisse

Da die Aktivierung bei beiden Expressionssystemen mit einer Abnahme der Spannungsabhängigkeit einherging, wurde durch schrittweise pH-Erniedrigung untersucht, wie sich die Effekte bei einer langsameren und stärkeren Azidifizierung der Badlösung entwickeln (Abb. 18 und 19). Neben der Vergrößerung der Gesamtamplitude führte die extrazelluläre Ansäuerung zu drastischen Veränderungen in der Kinetik des Stromes. Mit abnehmendem pH-Wert der Badlösung nahm der instantane Anteil kontinuierlich zu, so dass bei pH 4,0 der typische, verzögert aktivierende und deaktivierbare Strom fast vollständig verschwand. Die Strom-Spannungskurve verlor ihre sigmoide Form und wurde unter diesen Bedingungen linear. Dieser überwiegende, instantane Anteil konnte durch die KCNQ1-spezifische Hemmsubstanz HMR1556 nahezu vollständig inhibiert werden.

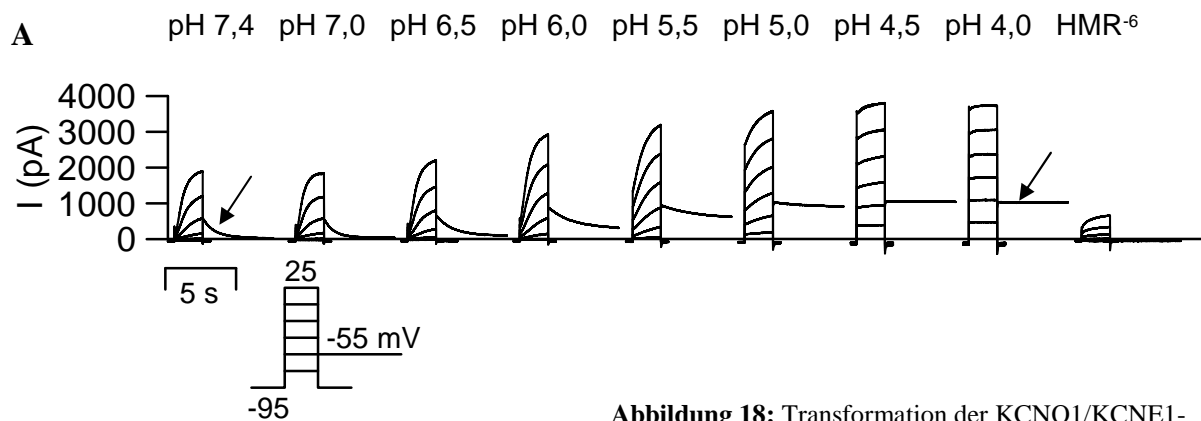
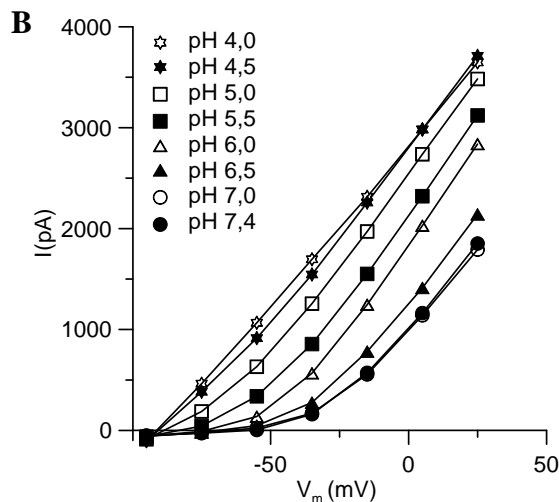


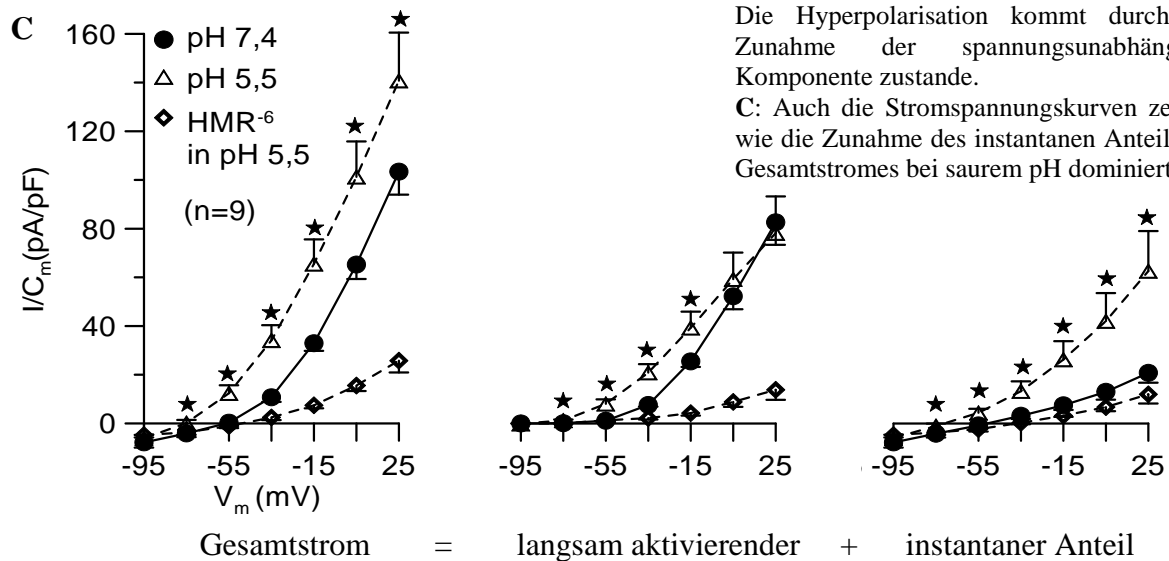
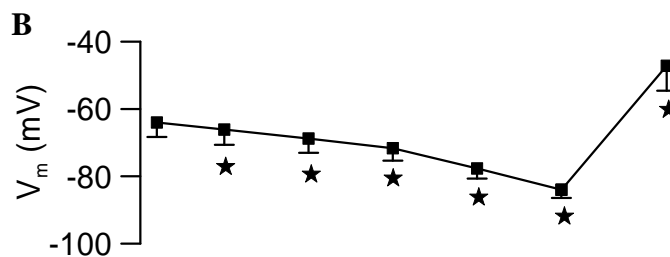
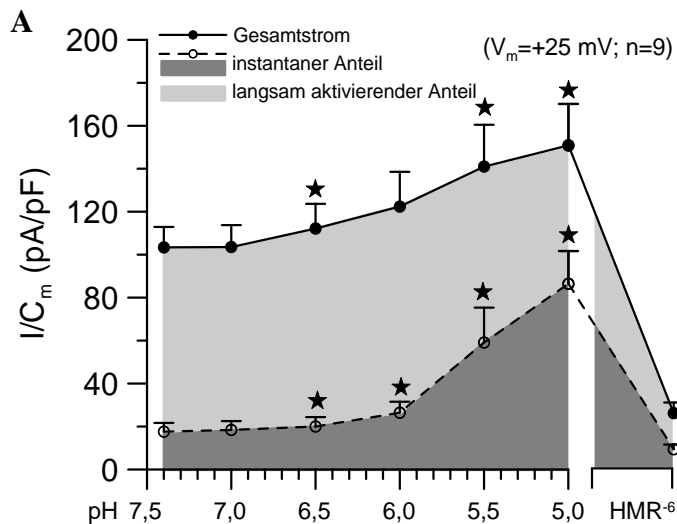
Abbildung 18: Transformation der KCNQ1/KCNE1-Kinetik durch sauren pH.



A: Der Originalausschnitt aus einem repräsentativen Experiment an KCNQ1/KCNE1-transfizierten CHO-K1-Zellen zeigt mit Hilfe übereinander gelagerter Stromkurven, wie sich die Kinetik in Abhängigkeit vom pH verändert. Der typische, langsam aktivierende und spannungsabhängige Strom wurde völlig instantan. Dies ist auch an der aufgehobenen Deaktivierung (Pfeile) abzulesen.

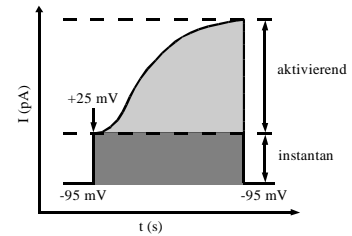
B: Dieser Effekt der Ansäuerung wird durch die Entwicklung der Stromspannungskurven dieser Zelle in Abhängigkeit vom pH-Wert verdeutlicht.

Unter pH 5,5 zeigte der verzögert aktivierende Anteil bei 25 mV Klemmspannung keine Unterschiede zum Kontrollwert ($85,79 \pm 9,32$ pA/pF bzw. $81,92 \pm 15,82$ pA/pF, $n=9$, $p=0,75$). Die Erhöhung der Gesamtstromamplitude wurde durch eine deutliche Zunahme des instantanen Anteils verursacht. Bei 25 mV Klemmspannung erhöhte er sich von $17,60 \pm 4,04$ pA/pF auf $59,08 \pm 16,26$ pA/pF ($n=9$, $p=0,02$) (Abb. 19).


Abbildung 19:

Auftrennung des KCNQ1/KCNE1-Stromes in instantanen und langsam aktivierenden Anteil.

(« = signifikant verschieden von pH 7,4)



A: Der Gesamtstrom bei 25 mV Klemmspannung nimmt unter sauren Bedingungen zu, wobei die Zunahme vom instantanen Anteil getragen wird. Der langsam aktivierende Anteil (Differenz zwischen Gesamtstrom und instantanem Strom) wird dagegen eher kleiner. Sowohl der langsam aktivierende als auch der instantane Anteil konnten durch KCNQ1-spezifische Hemmsubstanz HMR1556 nahezu vollständig inhibiert werden.

B: Parallel zu der Wirkung auf die Stromamplituden und -kinetik ist die zunehmende Hyperpolarisierung der Zellmembran während der pH-Erniedrigung dargestellt. Die Hyperpolarisation kommt durch die Zunahme der spannungsunabhängigen Komponente zustande.

C: Auch die Stromspannungskurven zeigen, wie die Zunahme des instantanen Anteils des Gesamtstromes bei saurem pH dominiert.

Der instantan gewordene Strom deaktivierte nicht, als das Membranpotenzial für 5 Sekunden von + 25 auf - 55 mV geklemmt wurde (Abb. 20 B). So stieg der nach einer Deaktivierung noch vorhandene Strom von $0,74 \pm 0,93$ pA/pF auf $12,07 \pm 3,31$ pA/pF ($n=5$, $p=0,01$). Außerdem erfolgte die Deaktivierung des nicht instantanen Anteils wesentlich langsamer. Unter Kontrollbedingungen waren $0,80 \pm 0,14$ s nötig, um 63 %-Deaktivierung zu erreichen, während bei einem extrazellulären pH von 5,5 sich die Zeit auf $1,90 \pm 0,30$ s ($n=5$, $p=0,01$) verlängerte. Die Aktivierungskinetik wurde dagegen nicht beeinflusst (Abb. 20 A).

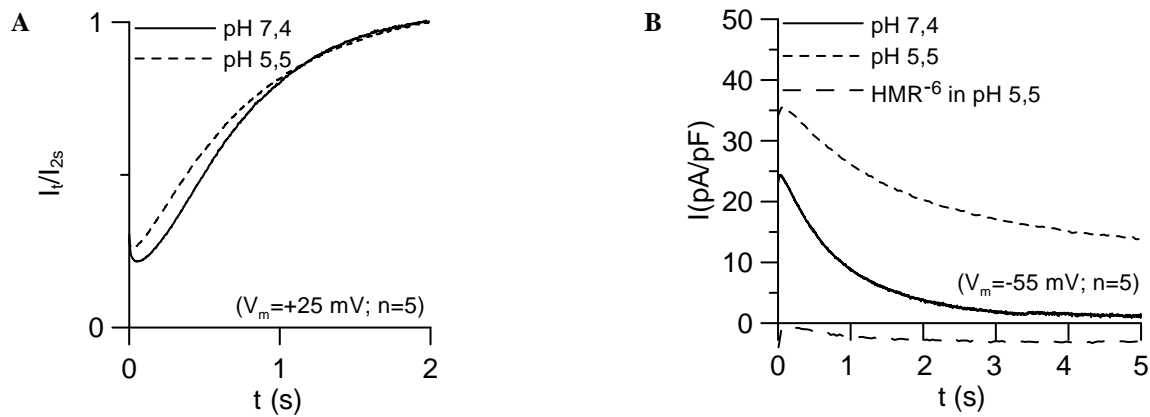


Abbildung 20: Einfluss des extrazellulären pHs auf die Kinetik des KCNQ1/KCNE1-Stromes.

A: Die Aktivierungskinetik der KCNQ1/KCNE1-Kanäle bleibt unverändert.

B: Der Deaktivierungsvorgang des KCNQ1/KCNE1-Stroms verläuft unter saurem pH langsamer und unvollständig, der Reststrom ist allerdings ebenfalls HMR1556-sensitiv und daher spezifisch.

Experimente an nicht transfizierten Zellen ergaben, dass der Gesamtstrom durch endogene Ionenkanäle während einer extrazellulären pH-Erniedrigung gehemmt wird, und dass der KCNQ1-Inhibitor HMR1556 wirkungslos bleibt (Abb. 21). Diese Beobachtung verifiziert eindeutig die KCNQ1/KCNE1-bedingte Herkunft des instantanen Anteils.

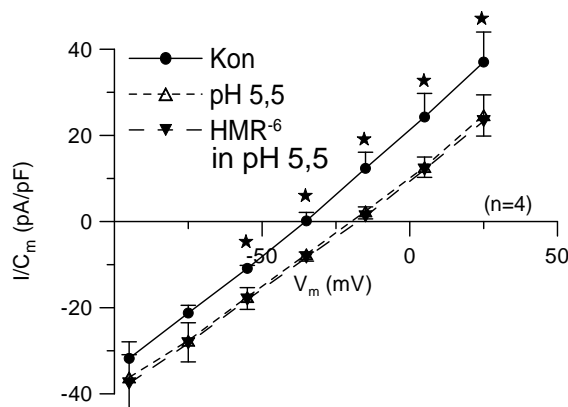


Abbildung 21:

Extrazelluläre Ansäuerung hemmte den endogenen Strom un behandelter COS-7-Zellen. Applikation des KCNQ1-Blockers HMR1556 blieb wirkungslos.

Um sekundäre zytosolische Vorgänge wie Ca^{2+} -Anstieg zu minimieren, wurde die pH-Regulation dieses Kanals auch in der exzidierten outside-out-Konfiguration untersucht. Auch in diesem Fall führte eine extrazelluläre Azidifizierung zu einer Aktivierung des Kaliumstromes (Abb. 22).

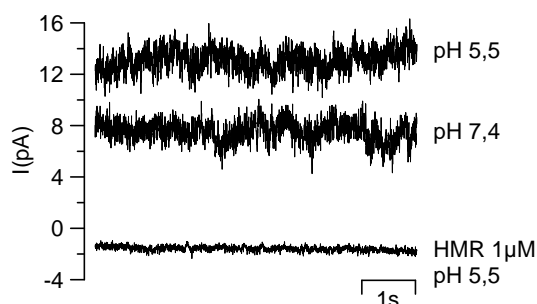


Abbildung 22:

Aktivierung des KCNQ1/KCNE1-Stromes durch extrazelluläre Azidifizierung in der exzidierten outside-out-Konfiguration bei einer Klemmspannung von -15mV.

3. Ergebnisse

Da es Hinweise darauf gibt, dass das Antiphlogistikum Mefenaminsäure auch eine Aktivierung des KCNQ1/KCNE1-Kanals bewirkt, die mit einer ähnlichen, aber temperaturabhängigen Transformation der Kinetik einhergeht [39], wurde in zusätzlichen Experimenten untersucht, ob die Temperatur auch die pH-Regulation beeinflusst. Wie bereits bekannt, führte die Erhöhung der Badtemperatur auf 37°C zu einer deutlich schnelleren Aktivierung und Deaktivierung des Kanals. Die pH-induzierten Effekte blieben allerdings qualitativ ähnlich (Abb. 23).

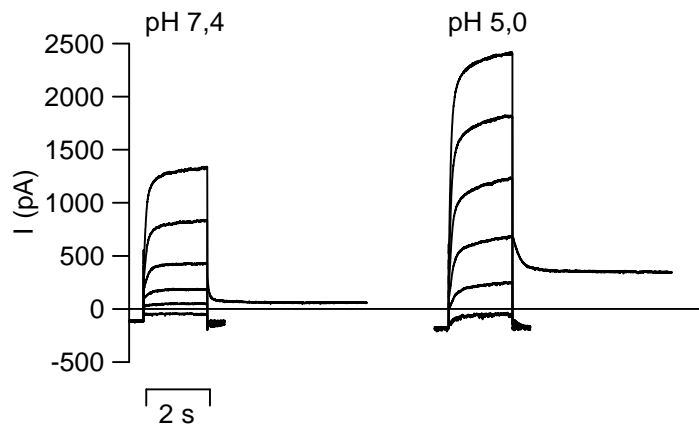


Abbildung 23:

Wirkung der extrazellulären Azidifizierung bei 37°C auf KCNQ1/KCNE1-Strom. Sowohl die Aktivierung an sich als auch die Modulation der Kinetik finden in ähnlichem Ausmaß statt wie bei 20°C (Raumtemperatur).

Im Gegensatz zu homomeren KCNQ1-Kanälen führte die isolierte zytosolische Azidifizierung durch 20 mM Acetat-Lösung ebenfalls zu einer Aktivierung des KCNQ1/KCNE1-Kanals, die allerdings mit ca. $13 \% \pm 30 \%$ ($n=5$, $p=0,01$) weniger stark ausgeprägt war und keine signifikante Verschiebung der Spannungsabhängigkeit zeigte, wohingegen eine gering ausgeprägte Transformation der Kinetik vom verzögert aktivierenden zum instantanen Zustand auch in diesem Fall beobachtet werden konnte. Besonders augenfällig war die Acetat-induzierte Verlangsamung von Aktivierung und Deaktivierung (Abb. 24).

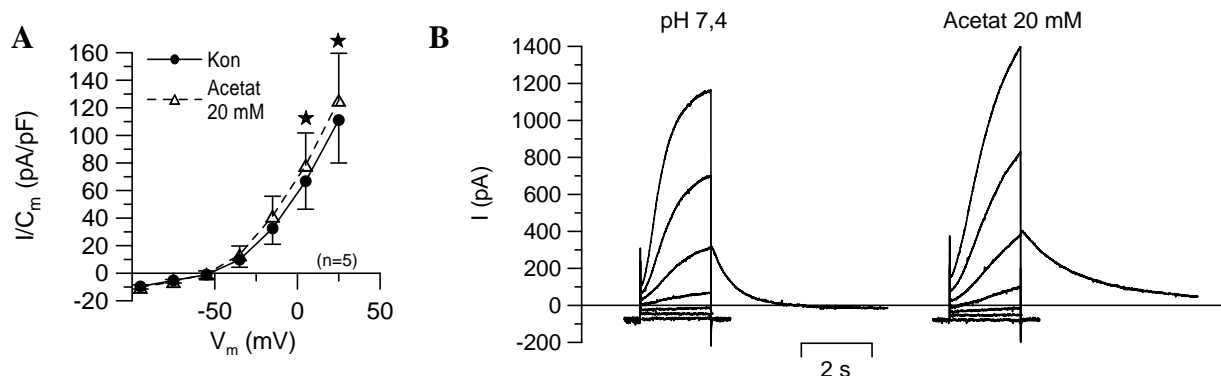


Abbildung 24: Leichte Aktivierung des KCNQ1/KCNE1-Stroms durch intrazelluläre Azidifizierung.

A: Stromspannungsbeziehung während der intrazellulären Azidifizierung durch 20 mM Acetatlösung.
B: Übereinander projizierte Stromkurven bei unterschiedlichen Klemmspannungen demonstrieren den Einfluss des zytosolischen pH-Wertes auf die Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik des KCNQ1/KCNE1-Kanals.

Einfluss von pH auf den KCNQ1/KCNE2-Strom

Vor kurzem konnte unsere Gruppe zeigen [14], dass der heteromultimere Kanal KCNQ1/KCNE2 in der luminalen Membran der Parietalzellen der Magenschleimhaut exprimiert wird und für die Salzsäuresekretion essentiell ist. Da der Kanal auf der extrazellulären Seite dem sauren Magensaft ausgesetzt ist, wurde untersucht, wie dieser Kanal durch den niedrigen pH-Wert beeinflusst wird. In patch-clamp-Experimenten an KCNQ1/KCNE2-exprimierenden COS-7-Zellen beobachteten wir eine signifikante Zunahme des 293B-sensitiven Ganzzellstromes durch sauren extrazellulären pH (Abb. 25 A). Patch-clamp-Untersuchungen in der outside-out-Konfiguration, bei der Ionenströme durch ein kleines von der Zelle abgetrenntes Membranfleck gemessen werden, zeigten ebenfalls eine Aktivierung des KCNQ1/KCNE2-Stromes durch extrazelluläre Azidifizierung (Abb. 25 B).

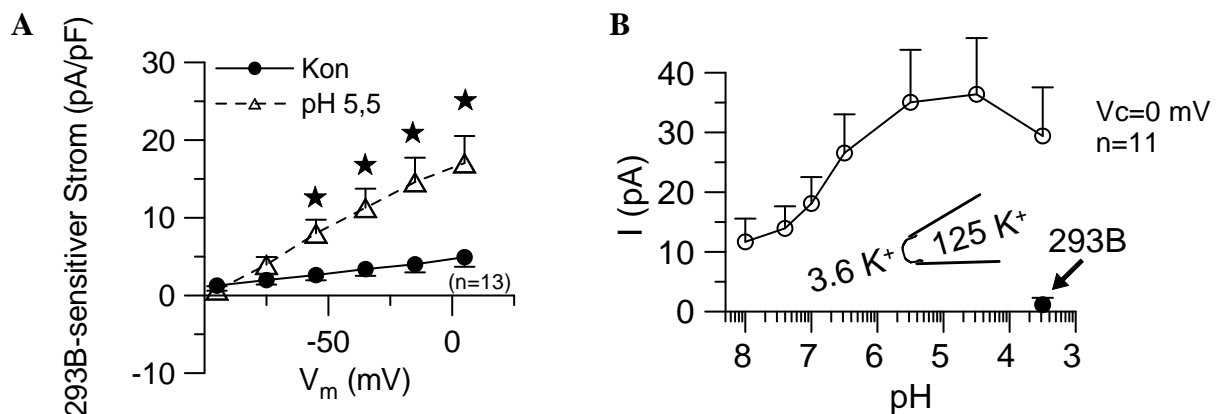


Abbildung 25: Einfluss des extrazellulären pH-Wertes auf den 293B-hemmbarer Strom bei KCNQ1/ KCNE2 exprimierenden COS-7-Zellen.

A: 293B-sensitiver Ganzzellstrom in Abhängigkeit von der Klemmspannung und vom extrazellulären pH.

B: Gemittelter outside-out-Strom bei 0 mV Klemmspannung in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert. 293B hemmte den Strom bei pH 3,5 fast vollständig.

Die Aktivierung war auch bezogen auf den gesamten Ganzzellstrom sichtbar. So stieg die Amplitude bei 25 mV Klemmspannung von $66,4 \pm 5,8$ pA/pF auf $83,9 \pm 6,9$ pA/pF ($n=20$, $p<0,01$) (Abb. 26 A).

Alkalinisierung der Badlösung auf pH 8,5 führte hingegen zu einer Hemmung des Kaliumstromes. Bei 25 mV sank die Amplitude von $70,2 \pm 9,3$ pA/pF auf $59,5 \pm 8,8$ pA/pF ($n=10$, $p<0,01$) (Abb. 26 B).

Im Gegensatz zu der extrazellulären Azidifizierung führte eine zytosolische pH-Erniedrigung durch 20 mM Acetat-Lösung zu einer Abnahme der Stromamplitude von $74,3 \pm 4,4$ pA/pF auf $61,8 \pm 5,6$ pA/pF ($n=4$, $p<0,01$) (Abb. 26 C).

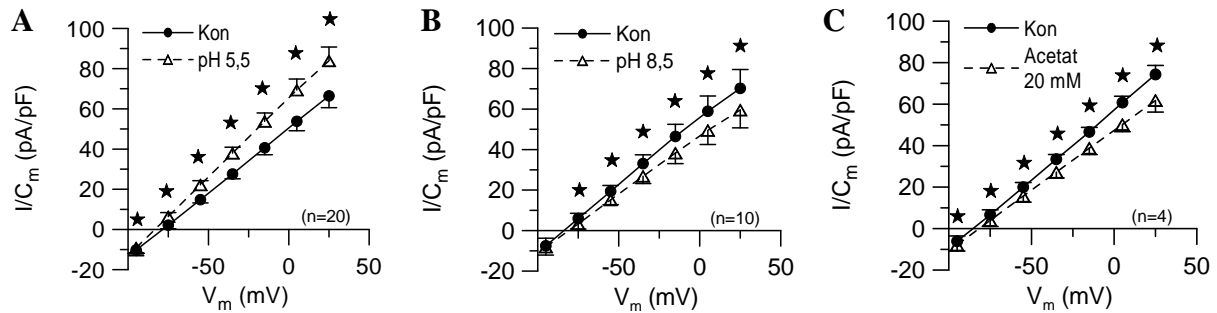


Abbildung 26: Gegenüberstellung von Wirkungen des pH-Wertes auf Ganzzellströme KCNQ1/KCNE2-kotransfizierter COS-7-Zellen.

A: Aktivierung durch Ansäuerung der Badlösung auf pH 5,5.

B: Hemmung des Stromes durch Alkalinisierung der Badlösung auf pH 8,5.

C: Hemmende Wirkung der zytosolischen pH-Erniedrigung durch 20 mM Acetat-Lösung

pH-Unempfindlichkeit durch Assoziation von KCNE3 mit KCNQ1

KCNQ1/KCNE3-Kanäle scheinen völlig pH-unempfindlich zu sein, weder extrazelluläre noch zytosolische pH-Wertänderungen beeinflussten die Stromeigenschaften (Abb. 27).

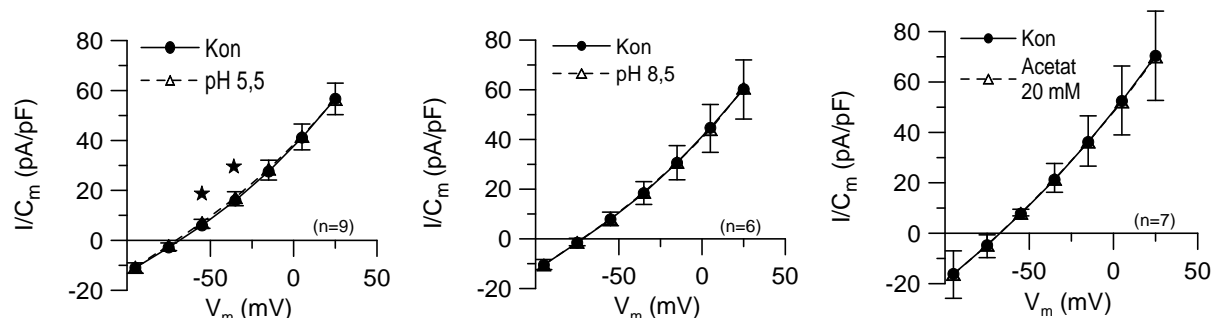


Abbildung 27: Absolute pH-Insensibilität der Ganzzellströme KCNQ1/KCNE3-kotransfizierter COS-7-Zellen.

Beeinflussung des zytosolischen pH-Wertes durch extrazelluläre pH-Veränderungen und 20 mM Acetatlösung

Um die Wirkung extrazellulärer Azidifizierung gegen die Wirkung zytosolischer pH-Erniedrigung abzugrenzen, muss untersucht werden, inwieweit der intrazelluläre pH-Wert von der Protonenkonzentration in der Badlösung beeinflusst wird. Dazu wurden mittels des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF Messungen des zytosolischen pH-Wertes unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. 20 mM Acetat-Lösung senkte diesen um $0,30 \pm 0,06$ Einheiten (n=12). Eine auf pH 5,5 eingestellte Badlösung azidifizierte die Zellen deutlich langsamer und geringer als Acetat (um $0,22 \pm 0,08$ pH-Einheiten, n=6).

3.2 Analyse der KCNE2-pH-Regulation mit Hilfe von Chimären

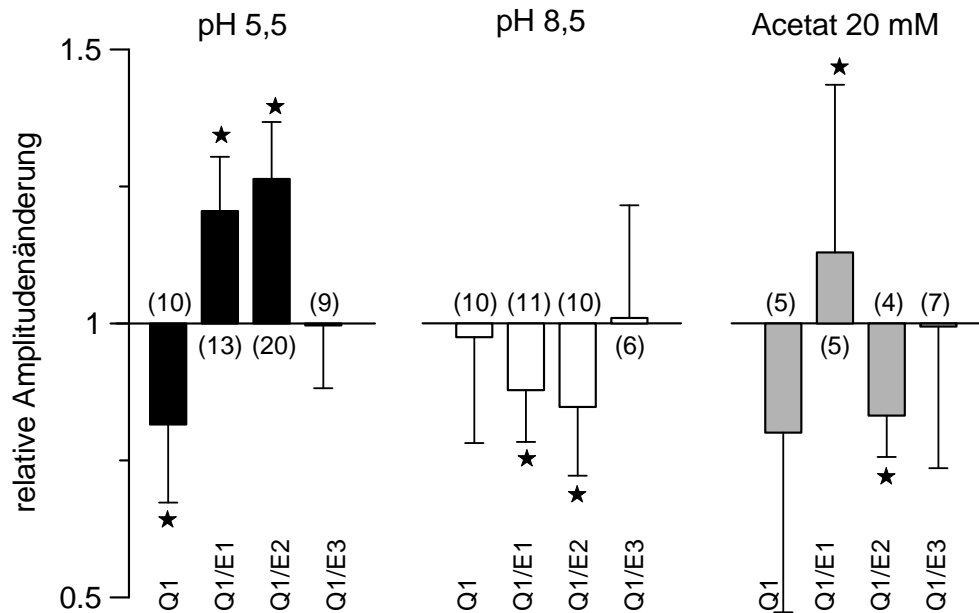


Abbildung 28: KCNE-spezifische Modulation der pH-Empfindlichkeit der KCNQ1-Kanäle

Zusammenfassung der relativen Amplitudenänderungen bei 25 mV Klemmspannung bezogen auf pH 7,4. Die akzessorischen KCNE-Untereinheiten bestimmen die pH-Empfindlichkeit der heteromeren KCNQ1-Kanäle. (★ = signifikant verschieden vom Strom bei pH 7,4)

Heteromere KCNQ1/KCNE2- und KCNQ1/KCNE3-Kanäle produzieren zwar einen ähnlichen, spannungsunabhängigen und instantanen Kaliumstrom, reagieren jedoch ganz unterschiedlich auf extrazelluläre und zytosolische pH-Wertänderungen (Abb. 28). KCNE2 führte zu einer starken Aktivierung, wohingegen KCNE3 den Kanal pH-unempfindlich machte. Mit Hilfe von Chimären aus den beiden β -Untereinheiten sollte nun untersucht werden, welche Region des KCNE2-Proteins den Effekt der extrazellulären Ansäuerung vermittelt. Da alle KCNE-Proteine aus einer Transmembrandomäne, einem extrazellulären N- und einem zytosolischen C-Terminus bestehen, wurden drei Chimären mit verschiedenen Anteilen von KCNE2 und KCNE3 konstruiert (Abb. 29).

Wurde der N-Terminus von KCNE3 mit der Transmembrandomäne und dem C-Terminus von KCNE2 kombiniert, führte die extrazelluläre Azidifizierung zu einer Hemmung des Stromes. Bei 25 mV Klemmspannung sank die Amplitude von $67,0 \pm 28,9$ pA/pF auf $49,2 \pm 21,7$ pA/pF ($n=6$, $p=0,02$) (Abb. 29, linke Spalte).

Enthielt die Chimäre nur den N-Terminus von KCNE2 und den Rest von KCNE3, konnte kein signifikanter Effekt beobachtet werden. Mit einer Tendenz zur Aktivierung veränderte sich die Stromamplitude nur leicht von $64,0 \pm 16,3$ pA/pF zu $72,5 \pm 19,8$ pA/pF ($n=16$,

3. Ergebnisse

$p=0,22$, $V_m=25$ mV) (Abb. 29, mittlere Spalte). Das heißt, der N-Terminus von KCNE2 ist zwar notwendig, aber nicht ausreichend, um die Säureaktivierung zu vermitteln.

Stammten sowohl der N-Terminus als auch die Transmembrandomäne von KCNE2, der C-Terminus jedoch von KCNE3, kam es zu einer deutlichen Aktivierung des Stromes während der Azidifizierung. Bei 25 mV Klemmspannung nahm der Strom von $145,2 \pm 32,5$ pA/pF auf $190,6 \pm 44,8$ pA/pF zu, was einer Aktivierung um ca. 31% entspricht (Abb. 29, rechte Spalte).

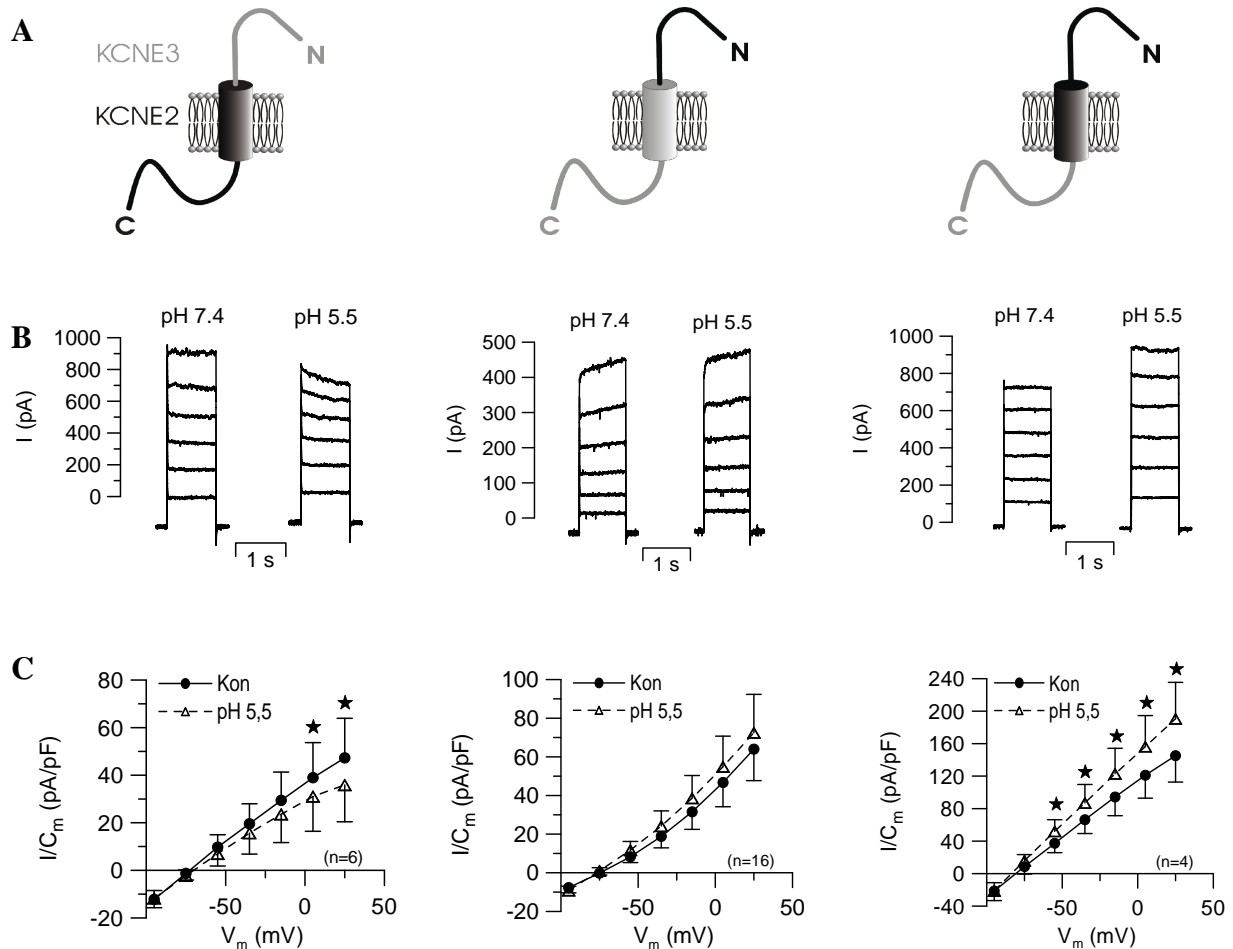


Abbildung 29: pH-Regulation der KCNE2-KCNE3-Chimären.

A: Modelle der Chimären aus KCNE2 und KCNE3: Der Anteil vom KCNE2-Protein ist jeweils schwarz dargestellt, KCNE3-Abschnitte sind grau. Der N-Terminus befindet sich extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär.

B: Originalauschnitte aus repräsentativen Experimenten zeigen die weitgehend spannungsunabhängige, KCNE2- bzw. KCNE3-typische Kinetik und die pH-Regulation der Chimären.

C: Strom-Voltage-Kurven der Ganzzellströme stellen den durchschnittlichen Effekt der extrazellulären Azidifizierung auf pH 5,5 dar. (Links: Verlust des KCNE2-N-Terminus führte zu einer Hemmung des Stromes. Mitte: N-Terminus von KCNE2 überspielt nicht die pH-Unempfindlichkeit des KCNE3-Anteils. Rechts: N-Terminus und Transmembrandomäne von KCNE2 reichen aus, um eine Aktivierung zu vermitteln.)

3.3 Wirkung von pH 5,5 auf die „gain-of-function“-Mutante R27C-KCNE2

Vor kurzem wurde eine neue gain-of-function-Mutation im Gen für KCNE2 bei Patienten mit der angeborenen Form des Vorhofflimmerns identifiziert [46]. Es wurde berichtet, dass die durch die Mutation bewirkte Substitution von Arginin durch Cystein eine starke Zunahme der Stromamplitude zur Folge hatte. Aus diesem Grund war es interessant zu untersuchen, ob die Aktivierbarkeit durch sauren pH erhalten blieb, oder der Kanal bereits maximal aktiviert war. In unseren Experimenten an KCNQ1/R27C-KCNE2-kotransfizierten CHO-Zellen konnte die durch die Mutation ausgelöste Erhöhung des Stromes im Sinne von „gain of function“ unter Kontrollbedingungen nicht bestätigt werden. Der Mittelwert der Amplitude bei 25 mV lag mit $43,98 \pm 14,28$ pA/pF sogar deutlich unter dem Durchschnittswert des Wildtypkanals ($66,4 \pm 5,8$ pA/pF). Die Aktivierung während der extrazellulären Azidifizierung auf pH 5,5 betrug ca. 42 % und war damit eher ausgeprägter als bei nicht mutierten KCNQ1/KCNE2-Kanälen (ca. 26 %) (Abb. 30).

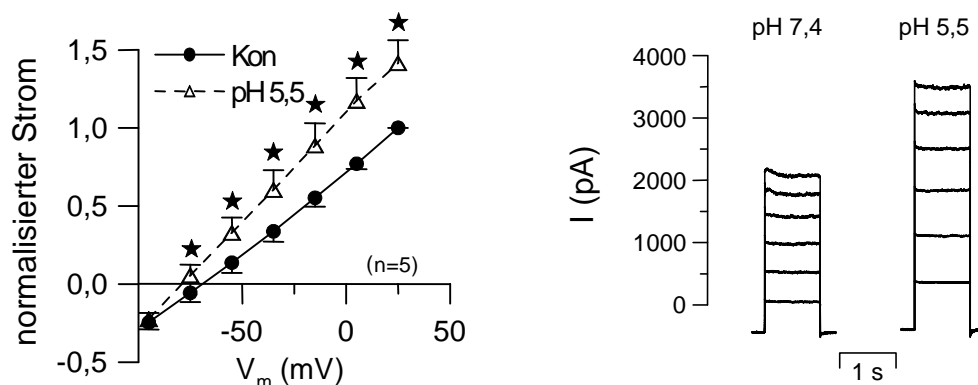


Abbildung 30: Wirkung der R27C-Mutation auf die pH-Regulation von KCNE2.

Die gemittelte, normalisierte Stromspannungskurve (links) und Ausschnitt aus einem Originalexperiment (rechts) zeigen, dass die R27C-Mutation bei KCNE2 eine normale Wirkung von saurem pH aufweist.

3.4 Pharmakologische Untersuchungen an KCNQ1/KCNE_x-Kanälen

KCNE-Untereinheiten modulieren nicht nur die biophysikalischen Eigenschaften der KCNQ1-Kanäle, sondern beeinflussen auch deren Empfindlichkeit für Pharmaka. 293B gilt als klassischer Blocker aller KCNQ1-Kanäle, wobei die Hemmung wesentlich stärker ausgeprägt ist, wenn akzessorische β -Untereinheiten vorhanden sind. Allerdings weist 293B bei höheren Konzentrationen unspezifische Wirkungen auf. Durch Modulationen der Seitenketten an der Chromanolgrundstruktur kann die Spezifität verstärkt werden. Im Folgenden wurden drei 293B-Derivate HMR1556, I_{Ks}124 und I_{Ks}125 im Hinblick auf ihre inhibitorische Wirkung auf heteromere und z. T. homomere KCNQ1-Kanäle getestet.

Wirkung des klassischen KCNQ1-Inhibitors 293B *

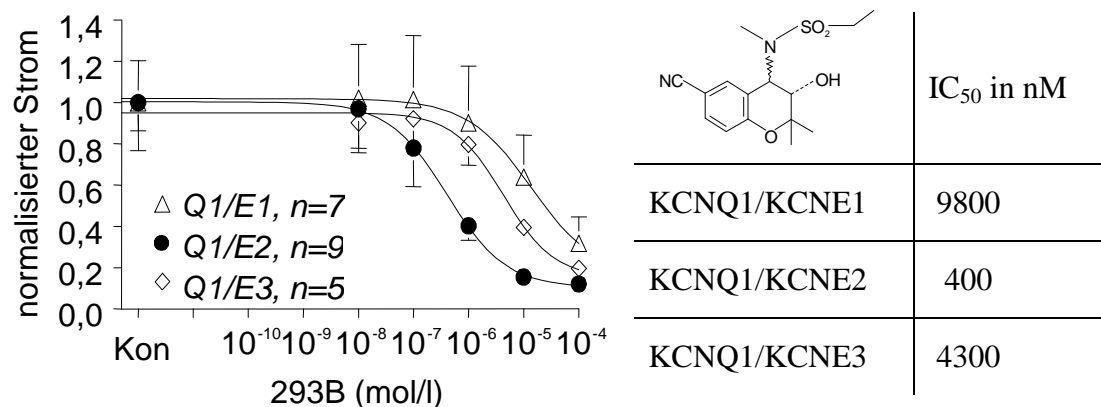


Abbildung 31: Übereinander projizierte normalisierte Konzentrations-Wirkungskurven der Hemmsubstanz 293B bei heteromeren KCNQ1-Kanälen. Rechts in der Tabelle sind die IC₅₀-Werte aufgelistet.

Der klassische KCNQ1-Inhibitor 293B, der als Ausgangssubstanz für zahlreiche Derivate dient, musste in relativ hohen Konzentrationen verwendet werden, um den Strom zu hemmen. So betrug die Konzentration des Blockers, bei der die Hälfte des Stromes inhibiert wurde (IC₅₀), bei KCNQ1/KCNE1 9800 nmol/l (n=7), bei KCNQ1/KCNE3 sank sie um die Hälfte auf 4300 nmol/l (n=9). Als besonders 293B-empfindlich erwiesen sich KCNQ1/KCNE2-Kanäle mit einer IC₅₀ von 400 nmol/l (n=5) (Abb. 31).

* untersucht von Dr. Heitzmann aus unserer Arbeitsgruppe [14]

Wirkung von IKs124 *

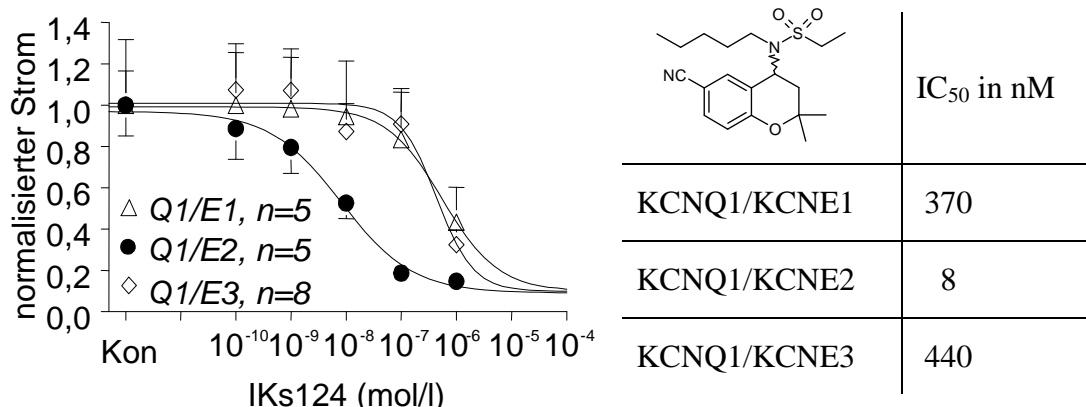


Abbildung 32: Konzentrations-Wirkungskurven der Hemmsubstanz IKs124 zeigen die hohe Affinität des Inhibitors zu KCNQ1/KCNE2-Kanälen.

Die Hemmsubstanz IKs124 hemmt in erster Linie den heteromeren KCNQ1/KCNE2- Kanal mit einer IC₅₀ von 8 nmol/l (n=5). Erst in etwa 50-facher Konzentration (370 bzw. 440 nM, n=5 bzw. 8) wurde der KCNQ1/KCNE1- und KCNQ1/KCNE3-Strom zur Hälfte gehemmt (Abb. 32).

Wirkung von IKs125

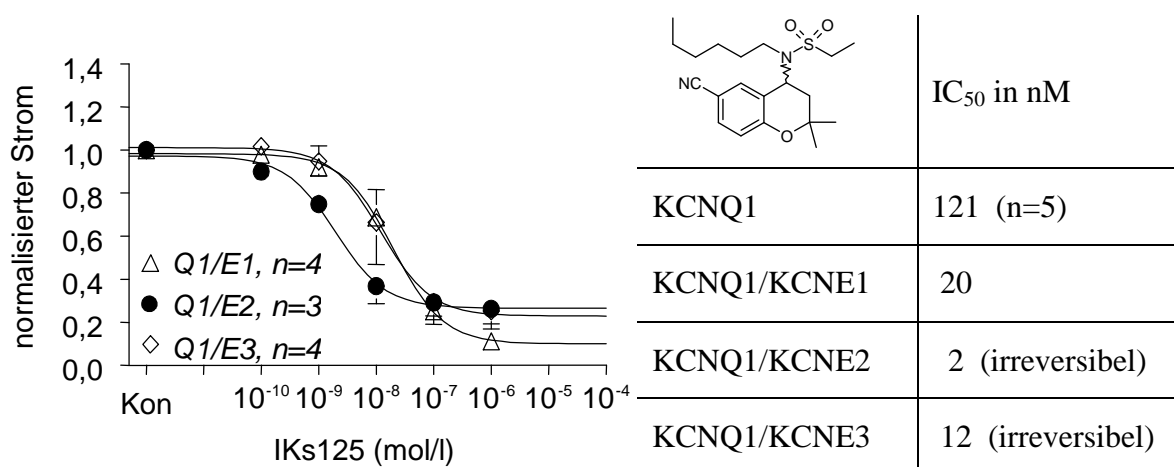


Abbildung 33: Relative Hemmung heteromerer KCNQ1-Kanäle durch IKs125.

Strukturell unterscheidet sich IKs125 von IKs124 durch eine einzige Methylgruppe, dennoch hatte diese Methylierung zur Folge, dass die bei IKs124 deutlich ausgeprägte Spezifität für KCNQ1/KCNE2 nicht mehr in dem Ausmaß vorhanden war. Zwar war die IC₅₀ bei KCNQ1/KCNE2-Kanälen mit 2 nmol/l am niedrigsten (n=3), jedoch wurden auch

KCNQ1/KCNE1- und KCNQ1/KCNE3-Strom mit einer IC_{50} von 20 bzw. 12 nmol/l ähnlich gut gehemmt ($n=4$), wohingegen bei homomeren KCNQ1-Kanälen höhere Dosierungen nötig waren ($IC_{50}=121$ nmol/l, $n=5$) (Abb. 33). Neben der sehr hohen Potenz war die Affinität von IKs125 zu KCNQ1/KCNE2 und KCNQ1/KCNE3 so stark, dass die Substanz nicht ausgewaschen werden konnte bzw. die Hemmung weitgehend irreversibel war.

Wirkung von HMR1556

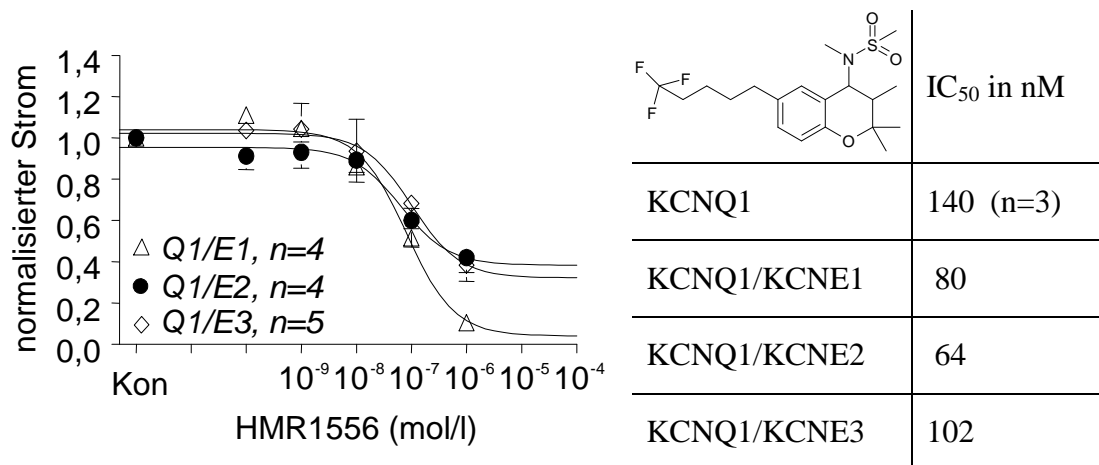


Abbildung 34: Konzentrations-Wirkungskurven für die relative Hemmung heteromerer KCNQ1-Kanäle durch HMR1556.

HMR1556 hemmte sowohl homomere als auch heteromere KCNQ1-Kanäle ähnlich stark. Die halbmaximale Inaktivierungskonzentration (IC_{50}) betrug bei KCNQ1 allein 140 nmol/l ($n=3$). Assoziation mit KCNE1 senkte die IC_{50} auf 80 nmol/l ($n=4$), KCNE2 auf 64 nmol/l ($n=4$), während KCNE3 mit einer IC_{50} von 102 nmol/l etwas schlechter hemmbar war (Abb. 34).

4. Diskussion

Der Kaliumkanal KCNQ1 ist vor allem im Herz und in Epithelien exprimiert und spielt dort eine wichtige physiologische und pathophysiologische Rolle. Er weist die Besonderheit auf, dass er in Gewebe-spezifischer Weise mit fünf verschiedenen β -Untereinheiten, KCNE1-5, Wechselwirkungen eingeht. Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welchen Einfluss diese KCNE-Untereinheiten auf die pH-Empfindlichkeit und die Pharmakologie des KCNQ1-Kaliumkanals haben.

4.1 Untersuchungen von Kanälen in Expressionssystemen

Bisher wurden die meisten Messungen von KCNQ1-Kanälen nicht an Säugetierzellen, sondern aus praktischen Gründen im *Xenopus laevis* Expressionssystem durchgeführt. Da jedoch *Xenopus laevis* Oozyten relevante Mengen an endogenen xKCNQ1-Kanälen besitzen und aus bisher unbekannter Ursache keine Assoziation von KCNE2 mit KCNQ1 zulassen, wurden in der vorliegenden Arbeit die epithelialen COS-7- und CHO-K1-Zelllinien als Expressionssysteme gewählt. Diese Säugetierzellen entsprechen in ihrer Regulatoren- bzw. Mediatorenausstattung, Glykosylierungsverhalten u. ä. eher den Verhältnissen beim Menschen als Eizellen eines Frosches.

Zur Untersuchung der Eigenschaften einzelner Ionenkanäle wurde eine gezielte Transfektion von Zelllinien aus zahlreichen Gründen der Untersuchung von Nativgewebe vorgezogen: Während im Nativgewebe, wie zum Beispiel im Herzmuskel, sehr viele verschiedene Ionenleitfähigkeiten eine Rolle spielen und eine selektive Untersuchung eines bestimmten Kanals erschweren, kann durch Transfektion von kultivierten Zellen erreicht werden, dass der Gesamtzellstrom fast ausschließlich von dem zu untersuchenden Kanal getragen wird. Interessanterweise scheint sogar die Biosynthese der eigenen Proteine zu Gunsten der aufgezwungenen Produktion von Fremdproteinen herabreguliert zu werden, so dass die Hintergrundleitfähigkeit durch endogene Ionenkanäle bei transfizierten Zellen deutlich geringer ist als bei unbehandelten Zellen. Man kann jedoch nicht ausschließen, dass die beobachteten Effekte durch endogene Faktoren, die im Nativgewebe in dieser Zusammensetzung nicht vorkommen, verfälscht werden. Auch umgekehrt ist es durchaus möglich, dass in der natürlichen Umgebung bestimmte, bisher unbekannte, regulatorische Proteine vorhanden sind, die im Expressionssystem fehlen.

Die technische Durchführung der Experimente gestaltet sich beim Arbeiten mit Expressionssystemen wesentlich einfacher, da die aufwendige Präparation und Isolierung der Zellen aus dem Nativgewebe entfällt. Des Weiteren sind die in Kulturschälchen wachsenden Zellen für die patch-clamp-Experimente besser geeignet, denn ihre Zellmembran ist nicht mit der extrazellulären Matrix bedeckt und erleichtert dadurch die nötige Ausbildung eines hohen Abdichtwiderstandes (Gigaseal) zwischen der Pipette und der Membran. Auch die Temperatur, bei der die Experimente durchgeführt wurden, spielt eine wichtige Rolle [39]. Aus experimentellen Gründen ist es wesentlich schwieriger bei 37 °C elektrophysiologisch zu arbeiten. Zwar erleichtert die erhöhte Fluidität der Zellmembran die Sealbildung, erschwert jedoch das Einreißen der Membran und destabilisiert deutlich die Ganzzellkonfiguration, so dass bereits geringste Erschütterungen durch Wechsel der Badlösung in vielen Fällen zum Abbruch des Experiments führen. Deshalb wurden die meisten Untersuchungen bei Raumtemperatur durchgeführt in der Annahme, dass die pH-vermittelten Effekte temperaturunabhängig sind. Im Fall von KCNE1 habe ich allerdings zusätzlich noch bei 37°C überprüft, ob die beobachtete Konversion des Stromes, die pathophysiologisch von großer Bedeutung sein könnte, auch bei normaler Körpertemperatur auftritt. Da sich das Ergebnis bestätigte, scheint die pH-Regulation tatsächlich – zumindest qualitativ – temperaturunabhängig zu sein.

Selbstverständlich ist es trotz aller Bemühungen nicht möglich, alle Umgebungsbedingungen den Verhältnissen des menschlichen Körpers anzugleichen. So tritt beispielsweise eine Azidose meist im Rahmen von Ischämien auf und wird von zahlreichen Nebenerscheinungen wie Kaliumanstieg, ATP-Abfall usw. begleitet, was experimentell nicht berücksichtigt werden kann, in vivo jedoch sehr wohl den Kaliumstrom beeinflusst. Auch die systemischen Regulations- und Kompensationsmechanismen sollten bei der Interpretation der Ergebnisse nicht vernachlässigt werden. Andererseits besteht eine einzigartige und zugleich realistische Chance, gezielt die Wirkung eines Parameters, in diesem Fall des pH-Wertes, auf einen bestimmten Kanal zu analysieren und zu verstehen, indem alle anderen Parameter auf ein Minimum reduziert oder konstant gehalten werden.

4.2 Gewebespezifische Modulation der KCNQ1-Kanäle durch akzessorische β -Untereinheiten

Auf der Suche nach einem mutierten Protein, das die hereditäre Form des Long-QT-Syndroms verursacht, wurde 1996 der spannungsabhängige Kaliumkanal KCNQ1 kloniert.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass KCNQ1 mit dem kleinen Protein KCNE1 assoziiert und den kardialen I_{Ks} -Strom erzeugt. Interessanterweise besteht KCNE1 aus lediglich 129 Aminosäuren und besitzt strukturell nur eine einzige membrandurchspannende Region mit einem extrazellulären N- und einem zytosolischen C-Terminus, so dass dieses Protein alleine keinen Ionenkanal formen kann. Allerdings assoziiert KCNE1 mit dem Kaliumkanal KCNQ1 und verändert dadurch die biophysikalischen Eigenschaften des gesamten Komplexes, weshalb es als akzessorische β -Untereinheit bezeichnet wird. Aus Expressionsanalysen weiß man, dass KCNQ1 in verschiedenen Geweben vorkommt, wobei dessen Expression nur in einigen Fällen, wie z.B. im Herzen, im Pankreas, in der Niere und im Innenohr, mit der von KCNE1 einhergeht. In anderen Geweben wurden mittlerweile andere β -Untereinheiten (KCNE2-5) als Assoziationspartner für KCNQ1 identifiziert. In Abhängigkeit von lokalen, gewebespezifischen Anforderungen können auf diese Weise die Eigenschaften desselben KCNQ1-Kanals so variiert werden, dass die Funktion optimal an das jeweilige Organ angepasst wird, ohne dass ein komplett neuer Kanal synthetisiert werden muss.

4.3 *pH-Regulation durch KCNE-Untereinheiten*

Viele Ionenkanäle sind pH-empfindlich und können nur in einem bestimmten, mehr oder weniger breiten pH-Bereich optimal funktionieren. Es gibt Hinweise aus elektrophysiologischen Untersuchungen, dass homomere KCNQ1-Kanäle durch einen erniedrigten pH-Wert gehemmt werden [7, 28]. Da jedoch im Organismus meist eine Assoziation mit gewebespezifischen regulatorischen KCNE-Proteinen erfolgt, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht, wie die unterschiedlichen KCNE-Untereinheiten die pH-Sensibilität des resultierenden heteromeren Kanals modulieren.

Homomere KCNQ1-Kanäle

In Abwesenheit von KCNE-Untereinheiten wurden homomere KCNQ1-Kanäle sowohl durch extrazelluläre als auch durch zytosolische Azidifizierung gehemmt. Allerdings ging die um ca. 20% verkleinerte Amplitude bei der extrazellulären pH-Erniedrigung von 7,4 auf 5,5 mit einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit um ca. 20 mV zu positiveren Werten einher, so dass die Inhibition in erster Linie dadurch erfolgte, dass der Kanal erst bei deutlich positiveren Membranpotenzialen aktiviert wurde. Eine rein intrazelluläre Ansäuerung durch

Acetatlösung führte dagegen zu einer schwächeren Hemmung, ohne die Spannungsabhängigkeit zu beeinflussen. Eine Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes um eine pH-Einheit hatte keine Auswirkungen.

Konversion des KCNQ1/KCNE1-Stromes durch sauren pH

Besonderheit der Aktivierung

Eine Koexpression von KCNQ1 und KCNE1 führte überraschenderweise zu einer völligen Umkehr der pH-Regulation, obwohl diese Untereinheit nur moderat die biophysikalischen Eigenschaften von KCNQ1 modifiziert. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Hemmung bewirkte die Assoziation mit KCNE1 eine deutliche Aktivierung des heteromeren Kanals während der extrazellulären Azidifizierung. Bei pH 5,5 nahm die Amplitude um ca. 20 % zu, die Spannungsabhängigkeit wurde um ca. 5 mV zu negativeren Werten verschoben und insgesamt geschwächt. Ähnlich wie bei homomeren KCNQ1-Kanälen waren die Effekte der rein zytosolischen Ansäuerung zwar in dieselbe Richtungweisend, jedoch bei weitem nicht so ausgeprägt. Eine Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes auf 8,5 inhibierte dagegen den Strom.

Nachdem die Azidifizierung von pH 7,4 auf 5,5 zu einer überraschenden Änderung der Kinetik geführt hat, habe ich im Folgenden die pH-Regulation des KCNE1/KCNQ1-Kanals genauer untersucht. Statt einer „einfachen“ Zunahme der Stromamplitude führte die schrittweise Azidifizierung bis pH 4,0 zu einer vollständigen Transformation der Stromeigenschaften. Die typische Kinetik mit der langsamen Aktivierung und Deaktivierung und der ausgeprägten sigmoiden Spannungsabhängigkeit wurde zunehmend durch ein instantanes Öffnungs- und Schließverhalten ersetzt. Vor einigen Jahren wurde entdeckt, dass KCNE2 und KCNE3 die Spannungsabhängigkeit von KCNQ1 aufheben. Dieser Befund war spektakulär und in der Fachwelt vieldiskutiert. Überraschenderweise kann KCNE1 ebenfalls eine ähnliche Wirkung hervorrufen: Denn obwohl KCNE1 unter normalen Bedingungen die Kinetik des KCNQ1-Kanals deutlich verlangsamt und seine Spannungsabhängigkeit verstärkt und zu depolarisierteren Membranpotenzialwerten verschiebt, reicht eine Azidifizierung aus, um den Kanal konstitutiv offen zu machen und damit biophysikalisch umzuwandeln, als wäre KCNE1 durch KCNE2 oder KCNE3 ersetzt worden.

Widersprüchliche Angaben aus der Literatur

Da KCNQ1/KCNE1-Kanäle u. a. das molekularbiologische Korrelat für den kardialen I_{Ks} -Strom darstellen und somit auch aus klinischen Gründen sehr wichtig sind, wurde deren

pH-Regulation bereits mehrfach untersucht. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen beschrieben Freeman LC et al. [7] sowie die Arbeitsgruppe von B. Attali [28] in ihren Publikationen eine Hemmung des I_{Ks} -Stromes unter sauren Bedingungen, wobei CHO-K1-Zellen und *Xenopus laevis* Oozyten als Expressionssysteme verwendet wurden. Da unsere ersten Befunde von transfizierten COS-7-Zellen stammten, führten wir dieselben Experimente auch an CHO-K1-Zellen durch, um expressionssystemspezifische Effekte auszuschließen. Die Aktivierung der KCNQ1/KCNE1-Kanäle durch extrazelluläre Azidifizierung unterschied sich weder qualitativ noch quantitativ bei den beiden Zelllinien. Sowohl Freeman als auch Attali benutzten allerdings eine etwas andere Pipettenlösung als wir. Der bedeutendste Unterschied war, dass unsere Pipettenlösung 0,1 millimolare cAMP-Lösung enthielt, um KCNQ1-Kanäle zu aktivieren. In zusätzlichen Untersuchungen (hier nicht gezeigt) bestätigten sich jedoch unsere Ergebnisse auch in Abwesenheit von cAMP.

Die entscheidende Ursache für die abweichenden Befunde liegt höchstwahrscheinlich in der Auswertung der Experimente. Da KCNQ1/KCNE1-Kanäle eine typische sigmoide Aktivierungskinetik zeigen, wird meist eine sog. „leak-current-subtraction“ durchgeführt, bei welcher der instantane Anteil des Stromes subtrahiert wird. Man geht davon aus, dass dieser instantane Strom durch endogene Ionenkanäle verursacht wird und somit unspezifisch ist. Während Attali angibt, den vermeintlichen Leckstrom subtrahiert zu haben, wird es in der Publikation von Freeman gar nicht erwähnt, obwohl die dargestellten Stromkurven eindeutig darauf hinweisen. Der wesentliche Effekt der Azidifizierung bestand jedoch aus unserer Sicht in der dramatischen Zunahme eben dieses instantanen Anteils, der KCNQ1/KCNE1-bedingt ist und daher nicht automatisch abgezogen werden darf.

Zwei Argumente sprechen dafür, dass es sich tatsächlich um eine Zunahme des KCNQ1/KCNE1-Stromes handelt:

1. Der endogene Strom nicht-transfizierter Zellen wird durch sauren pH gehemmt.
2. Der KCNQ1-spezifische Blocker HMR1556 inhibiert auch diesen instantanen Anteil, ohne bei nicht-transfizierten Zellen zu wirken.

Der KCNQ1/KCNE1-typische, langsam aktivierende Strom nimmt zwar ab, nicht aber weil er gehemmt wird, sondern aufgrund der Transformation des Kanals in einen konstitutiv offenen Zustand.

Der Grund, warum weder Freeman noch Attali diesen Effekt wahrnahmen, könnte möglicherweise darin liegen, dass sie mit einem modernen patch-clamp-Programm, bei dem die „leak-current-subtraction“ automatisch durchgeführt wird, arbeiteten und nicht direkt die Rohdaten analysierten.

Bedeutung der pH-Regulation durch KCNE1

Da KCNQ1 in Assoziation mit KCNE1 beispielsweise dem kardialen I_{Ks} -Strom zugrunde liegt, ist zu vermuten, dass diese pH-Regulation von pathophysiologischer Bedeutung ist. Eine zehnminütige Ischämie der Herzmuskulatur, wie sie bei zahlreichen kardiovaskulären Erkrankungen vorkommen kann, erniedrigt den lokalen pH-Wert um etwa eine Einheit [22], längere Ischämiephasen würden eine noch stärkere Ansäuerung des Gewebes bewirken. Als Konsequenz dieser pH-Erniedrigung könnte die Aktivierung des I_{Ks} -Stroms die Repolarisation der Kardiomyozyten beschleunigen bzw. die Aktionspotenzialdauer und damit die Refraktärzeit verkürzen. Hinzu kommt, dass aufgrund der Transformation der Kinetik, die bereits bei einer leichten Azidifizierung beginnt, der Kanal auch bei niedrigen Membranpotenzialen offen bleibt und nicht erst durch Depolarisation aktiviert werden muss. Die daraus resultierende Hyperpolarisation der Membran könnte die Auslösung von ventrikulärer ektopter Erregungsbildung erschweren und dadurch möglicherweise protektiv gegen die Entstehung von Kammertachykardien wirken. Dies wäre vielleicht eine Erklärung für die ausgeprägte Neigung zu Torsade-de-pointes-Anfällen bei Patienten mit der angeborenen Form des Long-QT-Syndroms, da ihnen ein solcher protektiver Mechanismus aufgrund von Mutationen in KCNQ1- oder KCNE1-Gen fehlt. Allerdings sollte man nicht außer Acht lassen, dass sehr viele Ionenkanäle und -pumpen an der Erregungsbildung im Herzen beteiligt sind und jedes dieser Proteine spezifisch durch den pH-Wert beeinflusst werden kann, so dass es sehr problematisch ist, einzelne Teilvorgänge für sich alleine zu betrachten [17, 27, 37]. Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass Azidosen meist im Rahmen von Ischämien auftreten und daher mit zahlreichen Begleiterscheinungen einhergehen, die ebenfalls einen Einfluss auf kardiale Ionenleitfähigkeiten ausüben können.

KCNE2 im Dienste der gastralen Salzsäureproduktion

Offensichtlich relevant ist die pH-Regulation durch die KCNE2-Untereinheit im Magen. Bei der Sekretion der Salzsäure durch die Parietalzellen der Magendrüsen pumpen H^+ - K^+ -ATPasen unter Energieverbrauch Protonen aus der Zelle hinaus und Kaliumionen entgegen der chemischen Triebkraft in die Zelle hinein. Die notwendige Rezirkulation dieser Kaliumionen erfolgt über luminale Kaliumkanäle, deren wichtigste Vertreter – wie unsere Arbeitsgruppe [14] und später auch andere Forscher [20] zeigen konnten – KCNQ1/KCNE2-Kanäle sind. Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben, dass die akzessorische Untereinheit KCNE2 den spannungsabhängigen und säureempfindlichen KCNQ1-Kanal zum einen völlig instantan macht, zum anderen eine Aktivierung des Stromes während einer pH-

Erniedrigung bewirkt. So führte die extrazelluläre Azidifizierung auf pH 5,5 zu einer Erhöhung der Stromamplitude um 26 %, wohingegen rein zytosolische Ansäuerung den Strom um ca. 17 % hemmte. Auf diese Weise können luminale KCNQ1/KCNE2-Kanäle den Kaliumausstrom bei beginnender Säuresekretion pH-bedingt erhöhen und damit der Aktivität der H^+ - K^+ -ATPase anpassen. Würde jedoch aufgrund einer Verletzung der Zellmembran der intrazelluläre pH sauer werden, könnte man vermuten, dass die daraus resultierende Hemmung des Kaliumausstroms lokal die Säureproduktion verringern würde, was man als zellulären Selbstschutzmechanismus auffassen kann.

Keine pH-Regulation bei KCNE3

Ganz anders als bei KCNE2 sieht die pH-Wirkung bei KCNE3 aus, obwohl auch diese β -Untereinheit wie KCNE2 die Spannungsabhängigkeit des KCNQ1-Kanals aufhebt. Weder Erhöhungen noch Erniedrigungen des extrazellulären oder zytosolischen pH-Wertes führten zu Veränderungen der Kanaleigenschaften. Über die physiologische Bedeutung dieser pH-Insensibilität kann nur spekuliert werden. Aufgrund der basolateralen Lokalisation im Kolon, in der Trachea und in anderen Cl^- -sezernierenden Epithelien sind KCNQ1/KCNE3-Kanäle einem weitgehend konstanten pH ausgesetzt, so dass eine pH-Regulation in diesem Fall nicht erforderlich ist [31].

4.4 Mechanismus der pH-Regulation

Direkter oder indirekter Effekt

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die pH-Regulation der heteromeren KCNQ1-Kanäle sehr spezifisch von der akzessorischen β -Untereinheit moduliert wird. Wie dies auf molekularer Ebene geschieht, ist nicht eindeutig klar. Während extrazelluläre pH-Änderungen den intrazellulären pH-Wert gleichsinnig beeinflussen, reagieren KCNQ1/KCNE_x-Kanäle zum Teil völlig unterschiedlich auf zytosolische bzw. extrazelluläre Ansäuerung. Daher kann man davon ausgehen, dass zwei verschiedene Mechanismen vorliegen, bzw. dass extrazelluläre pH-Veränderungen wahrscheinlich von außen wirken. Da dieselben Effekte der Azidifizierung im Fall von KCNE1 und KCNE2 auch in der outside-out-Konfiguration auftreten, bei der nur ein kleiner Membranfleck praktisch ohne Zytosol untersucht wird, scheint eine Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, beispielsweise durch Ca^{2+} , keine Rolle zu spielen. Ob allerdings eine pH-vermittelte Konformationsänderung der

KCNE-Proteine direkt die Leitfähigkeit des gesamten Kanals reguliert, und/oder die Modulation indirekt über veränderte Zellmembraneigenschaften erfolgt, bleibt unbeantwortet.

Stöchiometrie der Untereinheiten

Interessanterweise beobachteten wir bei den patch-clamp-Experimenten eine relativ hohe Streuung der pH-Wirkung. Sowohl die Aktivierung der KCNQ1/KCNE2-Kanäle als auch die dramatischen Effekte der Azidifizierung auf KCNE1 wurden zwar bei deutlich über 90% der transfizierten Zellen beobachtet, aber nicht bei allen. Dass die gewünschte Transfektion vorlag, ist als sicher anzunehmen, da die elektrophysiologischen Messungen untereinheitenspezifische Stromeigenschaften zeigten. Der Grund für die Streuung der pH-Wirkung könnte eventuell darin liegen, dass in diesen Fällen weniger KCNE-Proteine vorhanden waren. Für die Strommodulation war ihre Anzahl ausreichend, wohingegen die pH-Regulation möglicherweise etwas höhere Expression benötigt. Aus unserer Sicht ist es also nicht ausgeschlossen, dass die Stöchiometrie der KCNE-Proteine nicht festgelegt ist, sondern variieren kann. Denn während zahlreiche Befunde darauf hinweisen, dass sich KCNQ1-Untereinheiten – wie alle spannungsabhängigen Kaliumkanäle – immer tetramer zusammenlagern, gibt es keine soliden Aussagen über die Stöchiometrie der akzessorischen β -Untereinheiten [15].

Rolle des extrazellulären N-Terminus

Sowohl KCNE2 als auch KCNE3 machen den KCNQ1-Strom instantan und spannungsunabhängig, in der pH-Regulation unterscheiden sie sich jedoch grundlegend. Während KCNQ1/KCNE2-Kanäle durch extrazelluläre Azidifizierung aktiviert werden, führt eine Assoziation mit KCNE3 zum Verlust der pH-Sensibilität. Mit Hilfe von drei chimären Konstrukten aus den beiden Untereinheiten wurde untersucht, welche Region von KCNE2 für die Säureaktivierung verantwortlich ist. Da es sich um eine extrazelluläre pH-Erniedrigung handelt, hypothetisierten wir, dass der extrazellulär lokalisierte N-Terminus als pH-Sensor fungiert. Und tatsächlich wurde bei der Chimäre mit dem N-Terminus von KCNE3 und der Transmembrandomäne und dem C-Terminus von KCNE2 keine Aktivierung beobachtet, sondern sogar eine Hemmung. Der KCNE2-N-Terminus scheint folglich notwendig zu sein. Seine Anwesenheit alleine reicht allerdings nicht aus, da die Chimäre, die nur den N-Terminus von KCNE2 und den Rest von KCNE3 besaß, bestenfalls mit einer leichten Tendenz, jedoch nicht signifikant aktiviert wurde. Erst wenn auch die Transmembrandomäne

von KCNE2 stammte, kam es zu einer deutlichen Aktivierung. Diese war sogar etwas stärker ausgeprägt als bei KCNE2, weil möglicherweise eine Hemmung durch gleichzeitige intrazelluläre Ansäuerung nicht auftrat, da der zytosolische C-Terminus von der pH-unempfindlichen KCNE3-Untereinheit stammte. Die entscheidende Funktion der Transmembrandomäne könnte einerseits die richtige Positionierung des N-Terminus im gesamten Kanalkomplex sein, andererseits führt eine pH-vermittelte Konformationsänderung des N-Terminus eventuell auch zu Strukturveränderungen im Bereich der Transmembrandomäne, die ihrerseits eine Aktivierung des KCNQ1-Kanals auslösen. Allerdings sollte man bei der Interpretation und bei der Bewertung derartiger Chimärenuntersuchungen sehr vorsichtig und zurückhaltend sein, da es sich um künstliche Konstrukte mit einer möglicherweise völlig veränderten räumlichen Struktur handelt. Interessanterweise produzierten alle KCNE2-KCNE3-Chimären einen instantanen und spannungsunabhängigen Strom, was ihre Assoziation mit KCNQ1 beweist, unterschieden sich jedoch – wie erwartet – erheblich in der pH-Regulation. Aus diesem Grund ist die Wahrscheinlichkeit relativ hoch, dass die vorliegenden Ergebnisse aussagekräftig sind.

Bedeutung einzelner Aminosäuren

Wenn der pH-Sensor tatsächlich im Bereich des N-Terminus liegt, stellt sich die Frage, ob man ihn vielleicht auf eine einzige Aminosäure eingrenzen kann, deren Protonierung bei pH-Erniedrigung eine Konformationsänderung des gesamten Kanals auslöst. Aufgrund des isoelektrischen Punktes um pH 4 kommen vor allem die sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat in Betracht. Allerdings befinden sich beispielsweise im N-Terminus von KCNE2 vier Glutamyl- und drei Aspartylreste, wobei sie wahrscheinlich mit den zahlreichen basischen Aminosäuren interagieren. Da die existenten Sekundärstrukturvorhersagen nicht verlässlich sind, und man nicht weiß, wie die räumliche Beziehung der KCNE-Untereinheiten zum KCNQ1-Kanal aussieht, kann man keinen der Kandidaten ausschließen.

Die Substitution der 27. Aminosäure Arginin durch Cystein im N-Terminus von KCNE2 wurde vor kurzem als eine neue gain-of-function-Mutation bei Patienten mit der angeborenen Form des Vorhofflimmerns identifiziert [46]. Der beschriebenen Zunahme der Stromamplituden könnte derselbe Mechanismus wie bei der Säureaktivierung zugrunde liegen. Deshalb wurde untersucht, was in diesem Fall eine extrazelluläre pH-Erniedrigung bewirkt. Überraschenderweise war die Aktivierung beinahe doppelt so hoch, wie bei nicht mutierten KCNE2-Proteinen, wobei die unter Kontrollbedingungen relativ niedrigen Amplituden eher auf eine loss-of-function-Mutation hinwiesen. Der Verlust der positiven

Ladung von Arginin hatte möglicherweise zur Folge, dass der benachbarte saure, negativ geladene Aspartylrest (Position 24) nicht durch eine Salzbrücke stabilisiert wurde und dadurch während der pH-Erniedrigung leichter protoniert werden konnte. Welche Bedeutung dieses Aspartat bei der Säureaktivierung nicht mutierter Kanäle hat, und warum in der entsprechenden Publikation eine gain-of-function-Mutation beschrieben wurde, bleibt unklar.

4.5 Untereinheitenspezifische Pharmakologie der heteromeren KCNQ1-Kanäle

KCNE-vermittelte Änderung der Empfindlichkeit für Pharmaka

Neben der spezifischen Modulation der biophysikalischen Stromeigenschaften und der pH-Regulation beeinflussen KCNE-Untereinheiten auch die Empfindlichkeit heteromerer KCNQ1-Kanäle für Pharmaka. So verstärkte eine Assoziation mit KCNE2 die Wirkung von 293B, der Ausgangssubstanz für zahlreiche Inhibitoren, um den Faktor 10 bis 20 im Vergleich zu KCNE3 und KCNE1. Das 293B-Derivat IKs124 senkte noch zusätzlich die IC_{50} von 400 nM auf 8 nM, wobei die Affinität zu KCNE2 diesmal etwa 50-fach höher war als für andere KCNE-Untereinheiten [14]. Die mit IKs124 verwandte Substanz IKs125 unterschied sich strukturell nur durch eine einzige Methylgruppe, die jedoch die IC_{50} für KCNE2 bis auf 2 nM erniedrigte, allerdings auf Kosten der Untereinheitenspezifität, denn mit 20 bzw. 12 nmol/l war die IC_{50} für KCNE1 bzw. KCNE3 ähnlich niedrig. Interessanterweise verlief die Hemmung durch diese extrem potente Substanz im Fall von KCNE2 und KCNE3 irreversibel, während der inhibitorische Effekt bei KCNE1 ausgewaschen werden konnte. Ein weiterer Blocker, HMR1556, zeigte keine ausgeprägte Untereinheitenspezifität mit einer durchschnittlichen IC_{50} von etwa 80 nM. Von den getesteten Substanzen erwies sich also nur IKs124 als relativ untereinheitenspezifisch, wobei dessen KCNE2-Spezifität auf den Konzentrationsbereich zwischen 10^{-9} und 10^{-7} mol/l beschränkt war.

Chancen und Risiken der Anwendung der Kanalblocker

Das gewebespezifische Vorkommen heteromerer KCNQ1-Kanäle und die Erforschung ihrer zum Teil großen Bedeutung für die Organfunktion eröffnen neue therapeutische Angriffsmöglichkeiten. Neue Antiarrhythmika der Klasse III zur gezielten Inhibition des kardialen I_{Ks} -Stroms (KCNQ1/KCNE1), Reduktion der Salzsäuresekretion im Magen durch Hemmung der KCNQ1/KCNE2-Kanäle in den Parietalzellen oder Blockierung der

KCNQ1/KCNE3-Kanäle im Kolon bei der Behandlung der Cholera sind nur einige Beispiele für potentielle Einsatzgebiete selektiver Kanalblocker. Allerdings darf man nicht außer Acht lassen, dass selbst eine hohe Spezifität für ein bestimmtes KCNE-Protein nicht ausreichend ist, da zusätzlich gewährleistet werden sollte, dass die gewünschte Wirkung nur im Zielorgan entfaltet wird. Um die Hemmung der KCNQ1/KCNE2-Kanäle durch den selektiven Blocker IKs124 auf den Magen zu beschränken, sollte das Medikament beispielsweise nur im stark sauren pH wirken. Noch schwieriger ist die Entwicklung von antiarrhythmischen I_{Ks} -Blockern ohne Beeinflussung derselben KCNQ1/KCNE1-Kanäle im Innenohr.

4.6 Resümee

Die biophysikalischen Eigenschaften und die Pharmakologie der heteromeren KCNQ1-Kanäle werden in hohem Maße von den akzessorischen KCNE-Untereinheiten beeinflusst. Das bisher nicht für möglich gehaltene Ausmaß der Variabilität der KCNQ1/KCNE1-Kinetik in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert weist darauf hin, dass es sich bei der Modulation durch KCNE-Untereinheiten nicht um eine statische Determination handelt, sondern um einen dynamischen und regulierbaren Prozess.

5. Zusammenfassung

Der Kaliumkanal KCNQ1 weist relativ hohe Expressionsraten in ganz unterschiedlichen Geweben auf. Um die jeweiligen funktionellen Anforderungen zu erfüllen, assoziiert er mit spezifischen KCNE- β -Untereinheiten, welche die biophysikalischen Eigenschaften sowie die Pharmakologie des resultierenden Kanalkomplexes modulieren können. Vor kurzem wurde KCNE2 als die akzessorische β -Untereinheit von KCNQ1 in den Parietalzellen der Magenschleimhaut identifiziert. Neben der bereits bekannten Umwandlung des genuin spannungsabhängigen Kanals in einen konstitutiv offenen, spannungsunabhängigen Zustand, geht diese Assoziation mit einer Umkehr der pH-Regulation einher. Die Hemmung der homomeren KCNQ1-Kanäle während einer extrazellulären pH-Erniedrigung wird durch Koexpression mit KCNE2 in eine Aktivierung verändert.

Die vorliegende Arbeit erweitert den bisherigen Kenntnisstand über die Funktionen der KCNE-Untereinheiten um folgende Aspekte:

- Trotz KCNE2-ähnlicher Modulation der biophysikalischen Eigenschaften bewirkt eine Assoziation mit KCNE3 im Gegensatz zu KCNE2 eine komplette Aufhebung der pH-Regulation. Untersuchungen an chimären Konstrukten aus den beiden Untereinheiten deuten darauf hin, dass wahrscheinlich der N-Terminus von KCNE2 als pH-Sensor fungiert. Allerdings scheint auch die KCNE2-Transmembrandomäne eine essentielle Rolle bei der Vermittlung der Säureaktivierung zu spielen.
- Beim kardialen Kanalkomplex KCNQ1/KCNE1 führt eine extrazelluläre Azidifizierung nicht – wie bisher beschrieben – zu einer Hemmung des Stromes, sondern zu einer Aktivierung. Diese erfolgt durch Transformation des spannungsabhängigen, langsam aktivierenden Kanals in eine bisher nicht für möglich gehaltene, konstitutiv offene Form. Offensichtlich werden die biophysikalischen Eigenschaften der KCNQ1-Kanäle zwar von den KCNE-Untereinheiten moduliert, können aber vom pH-Wert und möglicherweise auch von anderen, noch unbekannten Faktoren dynamisch verändert werden.
- Pharmakologische Untersuchungen ergaben, dass die Empfindlichkeit für Pharmaka von den KCNE-Untereinheiten abhängt und für einzelne Hemmsubstanzen hohe Spezifität für bestimmte heteromere KCNQ1-Kanäle beobachtet werden kann.

In Anbetracht der häufigen kardiovaskulären Erkrankungen, die mit Ischämie und Azidose einhergehen, erscheint die pH-Regulation der kardialen KCNQ1/KCNE1-Kanäle besonders interessant. Ihre pathophysiologische Relevanz sollte daher in weiterführenden Experimenten am Nativgewebe und in vivo eingehender untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA (1999) MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 97:175-187.
2. Angelo K, Jespersen T, Grunnet M, Nielsen MS, Klaerke DA, Olesen SP (2002) KCNE5 induces time- and voltage-dependent modulation of the KCNQ1 current. *Biophys J* 83(4):1997-2006.
3. Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G (1996) K_vLQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium current. *Nature* 384:78-80.
4. Bendahhou S, Marionneau C, Haurogne K, Larroque MM, Derand R, Szuts V, Escande D, Demolombe S, Barhanin J (2005) In vitro molecular interactions and distribution of KCNE family with KCNQ1 in the human heart. *Cardiovasc Res* 67(3):529-538.
5. Busch AE, Suessbrich H (1997) Role of the ISK protein in the IminK channel complex. *Trends Pharmacol Sci* 18:26-29.
6. Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M, Lazdunski M (1998) A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* 17(12):3297-3308.
7. Freeman LC, Lippold JJ, Mitchell KE (2000) Glycosylation influences gating and pH sensitivity of I(sK). *J Membr Biol* 177(1):65-79.
8. Grahammer F, Herling AW, Lang HJ, Schmitt-Gräff A, Wittekindt O, Nitschke R, Bleich M, Barhanin J, Warth R (2001) The cardiac K⁺ channel KCNQ1 is essential for gastric acid secretion. *Pflugers Arch* 441(6):R143 (Abstract).
9. Greger R, Bleich M, Riedemann N, Van Driessche W, Ecke D, Warth R (1997) The role of K⁺ channels in colonic Cl⁻ secretion. *Comp Biochem Physiol* 118A(2):271-275.
10. Greger R, Bleich M, Warth R (1997) New types of K⁺ channels in the colon. *Wien Klin Wochenschr* 109(12-13):497-498.
11. Grunnet M, Jespersen T, Rasmussen HB, Ljungstrom T, Jorgensen NK, Olesen SP, Klaerke DA (2002) KCNE4 is an inhibitory subunit to the KCNQ1 channel. *J Physiol* 542(Pt 1):119-130.
12. Grunnet M, Olesen SP, Klaerke DA, Jespersen T (2005) hKCNE4 inhibits the hKCNQ1 potassium current without affecting the activation kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 328(4):1146-1153.
13. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
14. Heitzmann D, Grahammer F, von Hahn T, Schmitt-Graff A, Romeo E, Nitschke R, Gerlach U, Lang HJ, Verrey F, Barhanin J, Warth R (2004) Heteromeric KCNE2/KCNQ1 potassium channels in the luminal membrane of gastric parietal cells. *J Physiol* 561(2):547-557.
15. Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423(6935):33-41.
16. Kaczmarek LK, Blumenthal EM (1997) Properties and regulation of the minK potassium channel protein. *Physiol Rev* 77(3):627-641.

17. Keating MT, Sanguinetti MC (2001) Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 104(4):569-580.
18. Kunzelmann K, Bleich M, Warth R, Levy-Holzman R, Garty H, Schreiber R (2001) Expression and function of colonic epithelial KvLQT1 K⁺ channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28(1-2):79-83.
19. Kunzelmann K, Hübner M, Schreiber R, Levy-Holzman R, Garty H, Bleich M, Warth R, Slavik M, von Hahn T, Greger R (2001) Cloning and function of the rat colonic epithelial K⁺ channel KvLQT1. *J Membr Biol* 179(2):155-164.
20. Lambrecht NW, Yakubov I, Scott D, Sachs G (2004) Identification of the K efflux channel coupled to the gastric H,K ATPase during acid secretion. *Physiol Genomics*.
21. Lundquist AL, Manderfield LJ, Vanoye CG, Rogers CS, Donahue BS, Chang PA, Drinkwater DC, Murray KT, George AL, Jr. (2005) Expression of multiple KCNE genes in human heart may enable variable modulation of I(Ks). *J Mol Cell Cardiol* 38(2):277-287.
22. Marzouk SA, Buck RP, Dunlap LA, Johnson TA, Cascio WE (2002) Measurement of extracellular pH, K(+), and lactate in ischemic heart. *Anal Biochem* 308(1):52-60.
23. Melman YF, Krummerman A, McDonald TV (2002) KCNE regulation of KvLQT1 channels. Structure-function correlates. *Trends Cardiovasc Med* 12(4):182-187.
24. Melman YF, Um SY, Krummerman A, Kagan A, McDonald TV (2004) KCNE1 Binds to the KCNQ1 Pore to Regulate Potassium Channel Activity. *Neuron* 42(6):927-937.
25. Neher E, Sakmann B (1976) Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799-802.
26. Neher E, Sakmann B, Steinbach JH (1978) The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch* 375:219-228.
27. Nerbonne JM (2000) Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 525 Pt 2:285-298.
28. Peretz A, Schottelndreier H, Aharon-Shamgar LB, Attali B (2002) Modulation of homomeric and heteromeric KCNQ1 channels by external acidification. *J Physiol* 545(Pt 3):751-766.
29. Rivas A, Francis HW (2005) Inner ear abnormalities in a Kcnq1 (Kvlqt1) knockout mouse: a model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Otol Neurotol* 26(3):415-424.
30. Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT (1996) Coassembly of KvLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature* 384:80-83.
31. Schroeder BC, Waldegger S, Fehr S, Bleich M, Warth R, Greger R, Jentsch TJ (2000) A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* 403:196-199.
32. Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y, Rubie C, Hordt M, Towbin JA, Borggreffe M, Assmann G, Qu X, Somberg JC, Breithardt G, Oberti C, Funke H (1997) KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nature Genet* 17:267-268.
33. Schulze-Bahr E, Wedekind H, Haverkamp W, Borggreffe M, Assmann G, Breithardt G, Funke H (1999) The LQT syndromes--current status of molecular mechanisms. *Z Kardiol* 88(4):245-254.
34. Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S (1988) Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* 242(4881):1042-1045.

35. Tapper AR, George J (2001) Location and orientation of minK within the I_{Ks} potassium channel complex. *J Biol Chem*.
36. Tinel N, Diochot S, Borsotto M, Lazdunski M, Barhanin J (2000) KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J* 19(23):6326-6330.
37. Tristani-Firouzi M, Sanguinetti MC (1998) Voltage-dependent inactivation of the human K⁺ channel KvLQT1 is eliminated by association with minimal K⁺ channel (minK) subunits. *J Physiol (Lond)* 510:37-45.
38. Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ (1984) Calcium activities and fluxes inside small intact cells as measured with intracellularly trapped chelators. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 17:535-541.
39. Unsold B, Kerst G, Brousos H, Hubner M, Schreiber R, Nitschke R, Greger R, Bleich M (2000) KCNE1 reverses the response of the human K⁺ channel KCNQ1 to cytosolic pH changes and alters its pharmacology and sensitivity to temperature. *Pflugers Arch* 441(2-3):368-378.
40. Vallon V, Grahmmer F, Richter K, Bleich M, Lang F, Barhanin J, Völkl H, Warth R (2001) Role of KCNE1-dependent K⁺ fluxes in mouse proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* 12(10):2003-2011.
41. Waldegger S (2003) Heartburn: cardiac potassium channels involved in parietal cell acid secretion. *Pflugers Arch* 446(2):143-147.
42. Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature Genet* 12(1):17-23.
43. Warth R, Barhanin J (2002) The multifaceted phenotype of the knockout mouse for the KCNE1 potassium channel gene. *Am J Physiol* 282(3):R639-R648.
44. Warth R, Garcia Alzamora M, Kim K, Zdebek A, Nitschke R, Bleich M, Gerlach U, Barhanin J, Kim J (2002) The role of KCNQ1/KCNE1 K⁺ channels in intestine and pancreas: lessons from the KCNE1 knockout mouse. *Pflugers Arch* 443(5):822-828.
45. Warth R, Riedemann N, Bleich M, Van Driessche W, Busch AE, Greger R (1996) The cAMP-regulated and 293B inhibited K⁺ conductance of rat colonic crypt base cells. *Pflugers Arch* 432:81-88.
46. Yang Y, Xia M, Jin Q, Bendahhou S, Shi J, Chen Y, Liang B, Lin J, Liu Y, Liu B, Zhou Q, Zhang D, Wang R, Ma N, Su X, Niu K, Pei Y, Xu W, Chen Z, Wan H, Cui J, Barhanin J, Chen Y (2004) Identification of a KCNE2 Gain-of-Function Mutation in Patients with Familial Atrial Fibrillation. *Am J Hum Genet* 75:899-905.
47. http://www.emedu.org/ecg/images/longqt_1.jpg
48. http://www.grundkurs-ekg.de/rhythmus/e_torsade_de_pointes.jpg

7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Richard Warth für das Vergnügen, unter seiner Leitung zu promovieren, danken. Seine fachliche Kompetenz, seine Begeisterung für die Physiologie und nicht zuletzt seine freundliche Art weckten mein Interesse für das Fach und die damit verbundene Grundlagenforschung. Im Rahmen meiner Dissertation durfte ich an einem spannenden Projekt mitarbeiten und genoss seine hervorragende Betreuung und seine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft. Dafür danke ich ihm herzlich.

Weiterhin danke ich Dr. med. Dirk Heitzmann, der mit mir zusammen an diesem Projekt arbeitete. Er brachte mir die Grundlagen der Elektrophysiologie und der Zellkultur bei und stand mir auch später immer mit Rat und Tat zur Seite.

Für die Herstellung von zwei Chimären und vor allem für die Kunst, das ganze Labor aufzuheitern, möchte ich mich bei PhD Markus Reichold bedanken.

Christine Sterner danke ich für ihre unzähligen und schließlich mit Erfolg gekrönten Bemühungen bei der Anfertigung der dritten Chimäre bzw. der Punktmutationen.

Für ihre ständige Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung möchte ich mich bei Ines Tegtmeier bedanken.

Mein besonderer Dank gilt ausnahmslos allen Mitarbeitern für die angenehme, kollegiale und motivierende Atmosphäre im Labor.

Nicht zuletzt danke ich natürlich auch meiner Familie und meinen Freunden für ihre vielfältige Unterstützung.

8. Publikationen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sind bisher folgende Veröffentlichungen entstanden:

Originalarbeiten:

Heitzmann D*, Koren V*, Wagner M, Sterner C, Reichold M, Tegtmeier I, Volk T, Warth R (2007) KCNE Beta Subunits Determine pH Sensitivity of KCNQ1 Potassium Channels. Cell Physiol Biochem 19(1-4):21-32

* geteilte Erstautorenschaft

Kongressbeiträge:

Koren V, Heitzmann D, Reichold M, Warth R (2005) Subunit-specific pharmacology and pH dependence of KCNQ1/KCNE K⁺-channels. Pflügers Archiv 449 (Suppl. 1): P 09-2

Heitzmann D, Koren V, Reichold M, Barhanin J, Warth R (2006) Cardiac hKCNQ1/hKCNE1 channels are modulated by acidic pH. Acta Physiol 186 (Suppl. 1): OM01-1

Anhang I: Verwendete Abkürzungen

AM	Acetoxymethylester
ATP	Adenosontriphosphat
BCECF	2',7'-biscarboxyethyl-5(6)-carboxyfluorescein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CHO-Zellen	Chinese Hamster Ovary cells (Zelllinie aus dem Ovariepithel des Chinesischen Hamsters <i>crictus griseus</i>)
C _m	Kapazität der Membran
C _p	Kapazität der Pipette
COS-Zellen	Zelllinie aus den Nieren der grünen afrikanischen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
DAT	Digital Audio Tape
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
G _a	Eingangsleitfähigkeit
G _m	Membranleitfähigkeit
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HERG	human ether-a-go-go related gene
HMR1556	(3R, 4S)-(+)-N-[3-hydroxy-2,2-dimethyl-6-(4,4,4-trifluorobutoxy)chroman-4-yl]-N-methyl-ethanesulfonamide
I _{Ks}	langsame Komponente des kardialen I _K -Stroms (delayed rectifier K ⁺ -Strom) durch KCNQ1/KCNE1
IKS124	trans-6-cyano-4-(N-ethylsulfonyl-N-pentylamino)- 2,2 dimethylchromane
IKS125	trans-6-cyano-4-(N-ethylsulfonyl-N-hexylamino)- 2,2 dimethylchromane
KCNE1	Synonym: minK
KCNE2	Synonym: MiRP1 (<u>m</u> ink <u>r</u> elated <u>p</u> rotein 1)
KCNE3	Synonym: MiRP2 (<u>m</u> ink <u>r</u> elated <u>p</u> rotein 2)
KCNE4	Synonym: MiRP3 (<u>m</u> ink <u>r</u> elated <u>p</u> rotein 3)
KCNE5	Synonym: KCNE1-L (KCNE1-like protein)
KCNQ1	Synonym: KvLQT1
MEMα	Modified Eagle Medium
patch-clamp-Methode	Saugelektrodenteknik zur Messung von Membranströmen

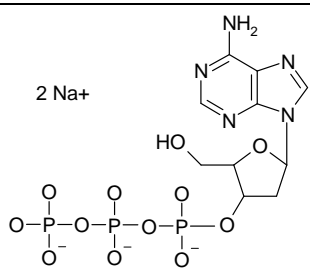
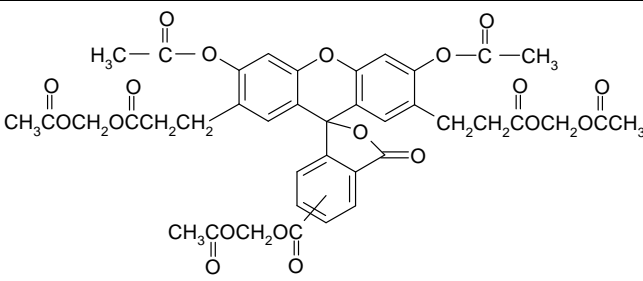
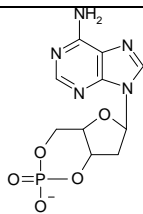
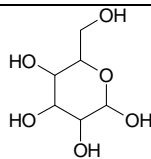
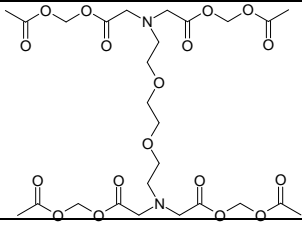
HGNC
 Gene Family
 Nomenclature

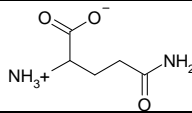
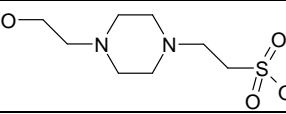
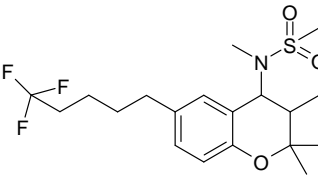
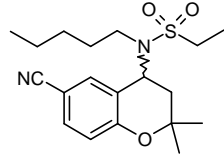
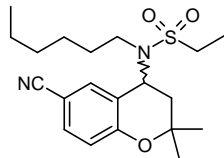
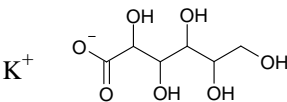
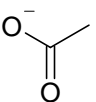
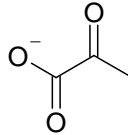
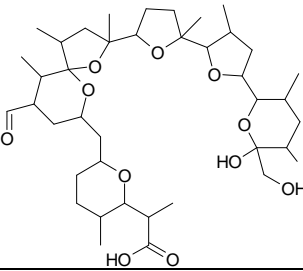
PCR	polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
R_s	Abdichtwiderstand zwischen Membran und Pipette
V_m	Membranpotenzial
<i>Xenopus laevis</i>	südafrikanischer Krallenfrosch
293B	trans-6-cyano-4-(N-ethylsulfonyl-N-methylamino)-3-hydroxy- 2,2 dimethylchromane

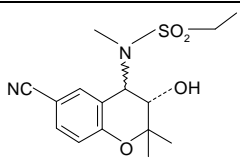
Anhang II: Bezugsquellen von verwendeten Geräten und Materialien

- 1) American Type Culture Collection, Washington, USA
- 2) Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
- 3) GIBCO, Paisley, GB
- 4) A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
- 5) Dynal ASA, Oslo, Norwegen
- 6) Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
- 7) Clark, Pangbourne, USA
- 8) Werkstatt des Physiologischen Institutes, Freiburg, Deutschland
- 9) S. Pfitzinger, H. Steinert, Physiologisches Institut, Freiburg, Deutschland
- 10) Axiovert 10, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- 11) LD Achroplan, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- 12) Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- 13) EPC-7 Nachbau, Dr. U. Fröbe, Physiologisches Institut, Deutschland
- 14) DTC-690, Sony, Köln, Deutschland, modifiziert von Dr. U. Fröbe
- 15) Dr. U. Fröbe, Physiologisches Institut, Deutschland
- 16) Frequency Devices, Garching, Deutschland
- 17) Intron DSO 2010, Datatec, Reutlingen, BRD
- 18) WeKagraph WK-450R, Werkzeugbau Kaltbrunn AG, Kaltbrunn, Schweiz
- 19) Axiovert 200, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- 20) XBO 75 W, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- 21) Typ 114, Schott, Mainz, Deutschland
- 22) Optisk Laboratorium, Lyngby, Dänemark
- 23) FT 510, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- 24) H 3460-04, Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan
- 25) Dr. Fröbe, Dr. Johna, Physiologisches Institut, Deutschland
- 26) OG 590, Schott, Mainz, Deutschland

Anhang III: Verwendete Chemikalien

Substanz	Genaue Bezeichnung/Beschreibung/ggf. Strukturformel	Bezug
ATP-Na ₂	Adenosintriphosphat-Dinatrium 	Sig
BamHI	Restriktionsenzym Schnittstelle: 5'-G↓GATC C-3' 3'-C CTAG↓G-5'	New
BCECF/AM	 2',7'-biscarboxyethyl-5(6)-carboxyfluorescein	Mol
Calciumchlorid	CaCl ₂	Rot
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat 	Sig
D(+)-Glukose		Mer
Dikaliumhydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄	Mer
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	Mer
EcoRI	Restriktionsenzym Schnittstelle: 5'-G↓AATT C-3' 3'-C TTAA↓G-5'	New
EGTA	ethylene-glycol-bis(β-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid 	Gib

Glutamin	polare Aminosäure		Gib
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine- N'-2-ethanesulfonic acid		App
HMR1556	(3R, 4S)-(+)-N-[-3-hydroxy- 2,2-dimethyl-6-(4,4,4-trifluoro- butoxy)chroman-4-yl]-N- methyl-ethanesulfonamide		Ave
IKs124	trans-6-cyano-4-(N-ethyl- sulfonyl-N-pentylamino)- 2,2- dimethylchromane		Ave
IKs125	trans-6-cyano-4-(N-ethyl- sulfonyl-N-hexylamino)- 2,2- dimethylchromane		Ave
Kaliumchlorid	KCl		Mer
Kaliumglukonat			Mer
Kaliumdihydro- genphosphat	KH ₂ PO ₄		Mer
Magnesiumchlorid	MgCl		Mer
Natriumacetat	Na ⁺ 		Mer
Natriumchlorid	NaCl		Mer
Natriumdihydro- genphosphat	NaH ₂ PO ₄		Mer
Natriumpyruvat	Na ⁺ 		Gib
Natronlauge	NaOH		Gib
Nigericin	Ionophor, K ⁺ /H ⁺ -Austauscher		Sig

Penicillin	β-Lactam-Antibiotikum	Gib
Pfu-Polymerase	DNA-Polymerase	Pro
Salzsäure 32 %	HCl	Mer
Streptomycin	Aminoglykosid	Gib
Trypsin	proteolytisches Enzym	Gib
293B	trans-6-cyano-4-(N-ethyl-sulfonyl-N-methylamino)-3-hydroxy-2,2-dimethylchromane 	Ave

App	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ave	Aventis, Frankfurt, Deutschland
Gib	GIBCO, Paisley, GB
Mer	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mol	Molecular Probes, Eugene, USA
New	New England Biolabs INC., Beverly, USA
Pro	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Rot	ROTH, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Sig	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Anhang IV: Lebenslauf

Viktoria Koren

30. Oktober 1981	geboren in Shitomir, Ukraine
Oktober 1993	Übersiedlung nach Deutschland

AUSBILDUNG

- SCHULE:

1988 – 1993	Grundschule in Shitomir, Ukraine
1993 – 1994	Hauptschule St. Jakob in Straubing
1994 – 2002	Ludwigsgymnasium in Straubing
Juni 2002	Abitur

- STUDIUM:

Seit 2002	Studium der Medizin an der Universität Regensburg
Herbst 2004	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Frühjahr 2009	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

- FACHARZTWEITERBILDUNG:

Seit August 2009	Assistenzärztin/ wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie (Prof. Nashan), Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
------------------	---

DISSERTATION

2004 – 2006	Doktorarbeit am Institut für Physiologie der Universität Regensburg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Richard Warth: „Einfluss der KCNE-Untereinheiten auf die pH-Sensibilität und Pharmakologie der KCNQ1-Kaliumkanäle.“
-------------	---

STIPENDIEN und AUSZEICHNUNGEN

Frühjahr 2002	Erfolg bei „Jugend forscht“: 1. Preis und zwei Sonderpreise für die Facharbeit im Leistungskurs Biologie
2005 – 2009	Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes

AUSLANDSAUFENTHALTE

Februar – April 2007	Famulatur am Massachusetts General Hospital, Abteilung für Handchirurgie (Prof. J. B. Jupiter), Harvard Medical School, Boston, USA
Juni – Oktober 2008	PJ-Tertial in Royal Perth Hospital, Abteilung für Anästhesie (Prof. S. Schug), University of Western Australia Forschung über Einfluss der inspiratorischen O ₂ -Konzentration auf Ischämie-Reperfusionsschaden