

**Elektrophysiologische  
Untersuchungen zur Regulation  
rekombinanter Kaliumkanäle durch  
Metabolite des Fettsäure- und  
Phosphoinositidstoffwechsels**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von**

**Dipl.–Ing. (Fh) Pharmazeutische Chemie Markus Rapedius**

**geboren am 06.07.1974 in Bernkastel-Kues**

Erster Gutachter: Prof. Dr. T. Baukrowitz

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. S. H. Heinemann

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Dr. J. Daut

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06. März 2006

## Abkürzungen

ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinder (Bovine) Serum Albumin
BS	Bartter's Syndrome
CPT1	Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1
CoA	Coenzym A
Cu-Phen	Cu(II)-1,10-Phenantroline
DTNB	5,5'Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
$E_K$	Gleichgewichtspotential für Kaliumionen
ENaC	Familie der epithelialen Natrium Kanäle (spannungsunabhängig, amilorid-sensitiv)
FAD	Flavinadenindinucleotid
$G_{\beta\gamma}$	G-Protein aus $\beta$ - und $\gamma$ -Untereinheit
GIRK	einwärtsgerichteter Kaliumkanal Kir3.1/3.4 (Heteromer)
GPCR	G-Protein vermittelter (coupled) Rezeptor
H	Hill-Koeffizient
IC <sub>50</sub>	Konzentration eines Inhibitors um 50 % des Ausgangsstromes zu blockieren
IRK	einwärtsgerichteter Kaliumkanal Kir2.1
K <sub>ATP</sub> -Kanal	ATP-abhängiger Kir6.1/Kir6.2 (+SUR) Kanal
Kir-Kanal	einwärtsgerichteter Kaliumkanal

LC-CoA	langkettige Fettsäure-Ester mit CoA
NAD	Nikotinsäureadenindinucleotid
PC	Phosphatidylcholin
pH <sub>0,5</sub>	pH-Wert der zur 50 % Inhibition des Ausgangsstromes führt
PI	Phosphatidylinositol
PIP	Phosphatidylinositol(4)phosphat
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat
PS	Phosphatidylserin
ROMK	einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal Kir1.1
SPD	Spermidin
SPM	Spermin
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor
TM	Transmembransegment

## **Inhaltverzeichnis**

Zusammenfassung .....	07
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>10</b>
1.1. Übersicht und molekularer Aufbau der Kir-Kanäle .....	11
1.2. Physiologische Funktion von Kir-Kanälen .....	14
1.2.1. Bedeutung der Einwärtsgleichrichtung .....	14
1.2.2. $K_{ATP}$ -Kanäle als metabolische Sensoren für die Insulinsekretion in pankreatischen $\beta$ -Zellen .....	16
1.3. Lipid-Regulation von Kir-Kanälen .....	18
1.3.1. Struktur und Stoffwechsel von Phosphoinositiden .....	18
1.3.1.1. Modulation der Kir-Kanalaktivität durch Phosphoinositide .....	20
1.3.2. Struktur und Stoffwechsel von LC-CoA Estern .....	21
1.3.2.1. Modulation der $K_{ATP}$ -Kanalaktivität durch LC-CoA .....	25
1.4. Kalium-Inaktivierung von Kir1.1-Kanälen .....	26
<b>2. Aufgabenstellung .....</b>	<b>30</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>31</b>
3.1. Mutagenese und cRNA-Synthese.....	31
3.2. Oozytenpräparation und Expression.....	31
3.3. Elektrophysiologie.....	32
3.4. Verwendete Lösungen und Chemikalien.....	33
3.5. Datenaufnahme und Datenauswertung.....	34

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
4.1. Modulation von $K_{ATP}$ -Kanälen durch Oleoyl-CoA und BSA .....	35
4.2. LC-CoA Regulation von Kir-Kanälen .....	39
4.2.1. Molekulare Determinanten der LC-CoA Inhibition .....	42
4.2.2. Mechanismus der LC-CoA Wirkung .....	45
4.3. Phosphoinositid-Spezifität der Regulation von Kir-Kanälen .....	47
4.4. Molekulare Mechanismen der Schaltvorgänge am Kir1.1-Kanal .....	50
4.4.1. pH-Gating von Kir1.1-Kanälen .....	50
4.4.2. PIP-Gating von Kir1.1- und Kir2.1-Kanälen .....	54
4.4.3. Lipid-Gating von Kir1.1-Kanälen .....	55
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>62</b>
5.1. Molekulare Determinanten der LC-CoA Regulation .....	62
5.2. Mechanismus der LC-CoA Inhibition von Kir-Kanälen .....	64
5.3. Physiologische Aspekte .....	67
5.4. Strukturelle Implikationen des Gatings von Kir1.1-Kanälen .....	70
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>74</b>
<b>7. Summary</b> .....	<b>80</b>
<b>8. Anhang</b> .....	<b>82</b>

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Regulation von einwärtsgerichteten Kaliumkanälen (Kir-Kanäle) durch langkettige Fettsäure-Coenzym A Ester und Phosphoinositide (z. B. PIP<sub>2</sub>) mit Hilfe der "patch-clamp"-Technik elektrophysiologisch untersucht. Kir-Kanäle werden in vielen Zelltypen (Myozyten, Neuronen, endokrine Zellen) exprimiert und sind maßgeblich an einer Reihe elektrophysiologischer Prozesse beteiligt wie z. B. dem kardialen und neuronalen Aktionspotential, der Insulinsekretion und der renalen Kaliumsekretion. Arbeiten der letzten Jahre zeigten, dass Kir-Kanäle durch bestimmte Lipide in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Zwei unterschiedliche Lipid-Klassen wurden in diesem Zusammenhang intensiv erforscht: Phosphoinositide (z. B. PIP<sub>2</sub>) und langkettige Fettsäure-Coenzym A Ester (z. B. Oleoyl-CoA). Erstere sind ständige Bestandteile der Plasmamembran und in eine Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden eingebunden. Letztere sind obligate Metabolite des zellulären Fettsäuremetabolismus deren intrazelluläre (und membranäre) Konzentrationen in bestimmten Stoffwechselsituationen erhöht sein können (Adipositas, Diabetes mellitus). Für beide Substanzklassen ist bekannt, dass sie an ATP-abhängige Kir-Kanäle (K<sub>ATP</sub>-Kanäle) binden und diese stark aktivieren. Die Aktivierung von pankreatischen K<sub>ATP</sub>-Kanälen durch LC-CoA in bestimmten Stoffwechselsituationen (z. B. Adipositas, Diabetes mellitus) ist möglicherweise an Insulinsekretionsstörungen beteiligt, welche beim Typ II Diabetes oft beobachtet werden. Die Regulation anderer Kir-Kanäle durch LC-CoA ist gegenwärtig nur wenig untersucht und Gegenstand dieser Arbeit.

Es wird gezeigt, dass - im Gegensatz zu der aktivierenden Wirkung auf K<sub>ATP</sub>-Kanäle - LC-CoA potente Inhibitoren aller getesteten Kir-Kanäle (Kir1.1, Kir2.1, Kir3.4, Kir7.1) sind. Eine detaillierte Untersuchung verschiedener LC-CoA Ester und anderer

Fettsäurederivate ergab, dass die Präsenz einer bestimmten Phosphatgruppe (die 3'-Ribosephosphatgruppe) im Coenzym A Molekül sowohl entscheidend für die Inhibition von Kir-Kanälen als auch für die Aktivierung des  $K_{ATP}$ -Kanals ist. Des Weiteren sind die Länge der Fettsäurekette und die Potenz der Inhibition direkt korreliert. Dieser Zusammenhang ist wahrscheinlich in einer höheren Membrankonzentration längerer LC-CoA begründet. Die elektrophysiologische Charakterisierung der LC-CoA Inhibition impliziert folgenden Wirkmechanismus: LC-CoA und  $PIP_2$  binden mit ähnlicher Affinität an eine gemeinsame Bindungsstelle in allen Kir-Kanälen, aber nur im  $K_{ATP}$ -Kanal führt LC-CoA zu einer Aktivierung. In allen anderen Kir-Kanälen bedingt hingegen die Verdrängung des Aktivators  $PIP_2$  (oder anderer Phosphoinositide) durch LC-CoA eine Inhibition. LC-CoA können folglich als kompetitive Antagonisten der aktivierend wirkenden Phosphoinositide betrachtet werden. Der hier etablierte Regulationsmechanismus impliziert eine direkte Verbindung aller Kir-Kanäle mit dem zellulären Fettsäuremetabolismus.

Neben Lipiden werden Kir-Kanäle auch durch eine Vielzahl anderer intrazellulärer Faktoren (z. B. ATP, pH,  $G_{\beta\gamma}$ -Proteine) in ihrer Aktivität reguliert. Das Verständnis dieser Regulationsmechanismen ist zentral für die vielfältigen Funktionen der Kir-Kanäle und deren Pathophysiologie. Die intrazellulären Faktoren binden an verschiedene Stellen in den Kir-Kanalproteinen und führen entweder zum Öffnen ( $G_{\beta\gamma}$ -Proteine,  $PIP_2$ ) oder zum Schließen (ATP, Protonen, LC-CoA) der Kanalpore. Die molekularen Mechanismen dieser Schaltvorgänge sind weitgehend unbekannt und Bestandteil des 2. Kapitels dieser Arbeit. Es konnte gezeigt werden, dass eine  $PIP_2$ -Depletion (z. B. durch LC-CoA) von strukturellen Veränderungen des Kanals begleitet wird, welche sowohl intra- als auch extrazelluläre Proteinabschnitte involvieren. Weitergehende Experimente identifizierten den Selektivitätsfilter des Kir1.1-Kanals als Teil der Gating-Maschinerie, die das Öffnen

und Schließen des Kanals vermittelt. Die Untersuchungen wurden vergleichend für das pH- und Lipid-Gating (LC-CoA, PIP<sub>2</sub>) von Kir1.1-Kanälen durchgeführt. Die Resultate legen die Vermutung nahe, dass unterschiedliche Regulationsfaktoren (pH, Lipide) eine universelle (evolutionär konservierte) Schaltmaschinerie benutzen, um ähnliche Konformationsänderungen der Kir1.1-Kanalproteine zu erzeugen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind veröffentlicht unter:

Schulze D, Rapedius M, Krauter T und Baukrowitz T. 2003. Long-chain acyl-CoA esters and phosphatidylinositol phosphates modulate ATP inhibition of K<sub>ATP</sub> channels by the same mechanism. *J Physiol*, (552.2): 357 – 367.

Rapedius M, Soom M, Shumilina E, Schulze D, Lang F, Schonherr, R, Tucker SJ and Baukrowitz T. 2005. Long chain CoA esters as competitive antagonists of PIP<sub>2</sub> activation in Kir channels. *J Biol Chem*, 280(35): 30760-7.

## 1. Einleitung

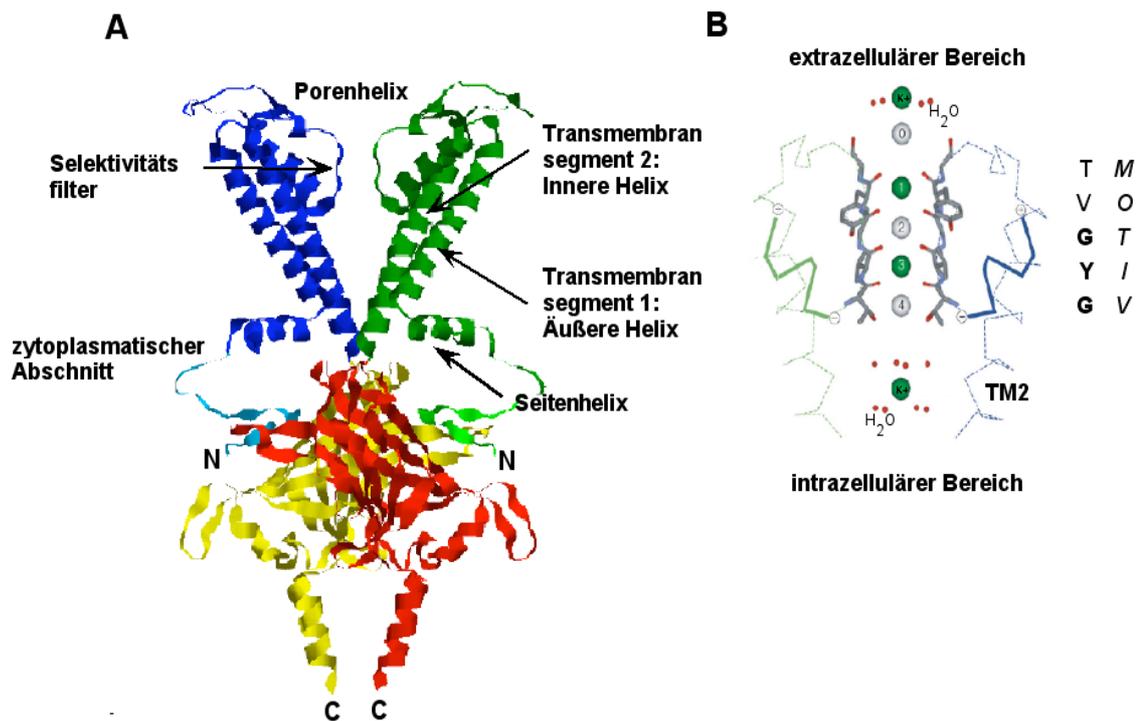
Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit elektrophysiologischen Untersuchungen an Ionenkanälen, die zur Familie der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle (Kir-Kanäle (ir = inward rectifier)) gehören. Kir-Kanäle sind in nahezu allen elektrisch erregbaren Zellen exprimiert und beispielsweise an der Ausbildung kardialer Aktionspotentiale, der pankreatischen Insulinsekretion oder an der Kaliumsekretion in der Niere beteiligt.

Kir-Kanäle werden durch eine Vielzahl intrazellulärer Faktoren ( $G_{\beta\gamma}$ -Proteine, Protonen, ATP) in ihrer Aktivität reguliert. Daneben zeigten Untersuchungen der letzten Jahre, dass Membran-Lipiden eine wichtige Bedeutung in der Regulation von Kir-Kanälen zugesprochen werden kann. Gegenstand neuerer Forschungsarbeiten sind dabei insbesondere Phosphoinositide, z. B.  $PIP_2$ , deren Konzentration in der Membran durch den komplexen Phosphoinositidmetabolismus bestimmt wird. Intensive Studien um die Wirkung dieser Substanzklasse zeigten, dass  $PIP_2$  alle Kir-Kanäle aktiviert und mit positiven Aminosäuren der zytoplasmatischen Proteinabschnitte interagiert. In  $K_{ATP}$ -Kanälen (Kir6.2/SUR) wirken langkettige Fettsäure-CoA Ester (LC-CoA) in ähnlicher Weise wie  $PIP_2$  und führen ebenfalls zu einer dramatischen Reduktion der ansonsten hohen Empfindlichkeit gegenüber der Inhibition durch intrazelluläres ATP. Die Wirkung von LC-CoA auf  $K_{ATP}$ -Kanäle gilt als etabliert, unklar ist jedoch inwieweit auch andere Kir-Kanäle reguliert werden.

Gegenstand dieser Arbeit sind Untersuchungen der Wirkung von LC-CoA auf verschiedene Vertreter der Kir-Familie. Des Weiteren sollte der molekulare Mechanismus der Regulation von Kir-Kanälen durch LC-CoA aufgeklärt werden.

## 1.1. Übersicht und molekularer Aufbau der Kir-Kanäle

Anstrengungen auf dem Gebiet der Röntgenkristallstrukturanalyse brachten im Jahre 1998 die erste Kristallstruktur eines Ionenkanals zum Vorschein. Der Gruppe um MacKinnon war es gelungen, einen Kaliumkanal (KcsA) von *Streptomyces lividans* zu kristallisieren (Doyle et al. 1998). Auch sich anschließende Arbeiten haben im besonderen Maße das Verständnis der Struktur von Kir-Kanälen erweitert, da die kristallisierten bakteriellen Kanäle (MthK, KirBac) wahrscheinlich eine ähnliche Struktur wie die noch nicht kristallisierten eukaryontischen Kir-Kanäle besitzen (Jiang et al. 2002, Kuo et al. 2003).

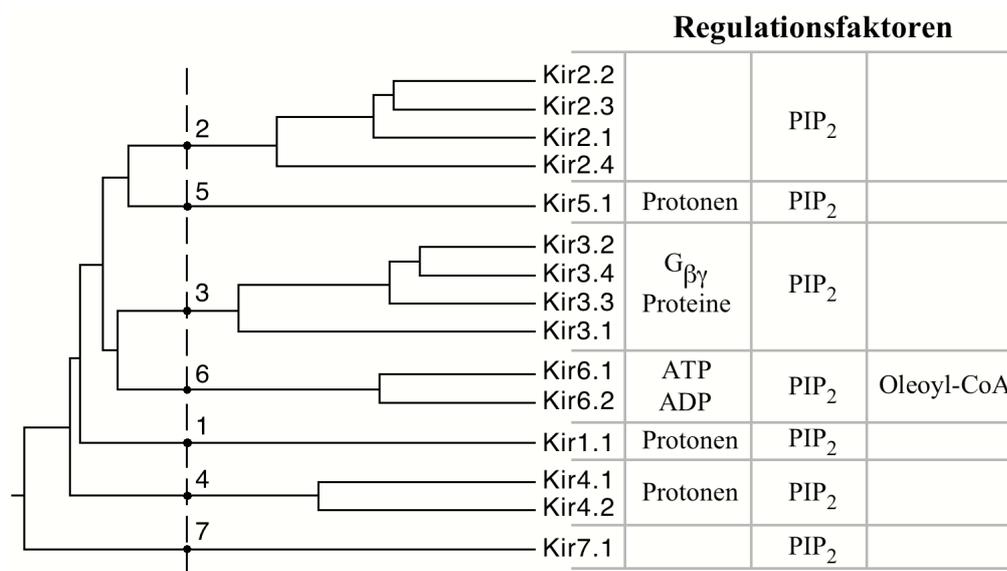


**Abb. 1.1:** **A) Struktur des KirBac1.1 Kanalproteins (Bichet et al. 2003).** Zur Vereinfachung wurden nur zwei der vier Untereinheiten dargestellt, die eine geschlossene Kanalkonformation ausbilden. **B) Struktur des Selektivitätsfilters (Bichet et al. 2003).** Die vergrößerte Ansicht des Selektivitätsfilters des KcsA-Kanals zeigt die lineare Anordnung von Kalium Bindungsstellen als weiße (unbesetzt) und grüne (besetzt) Kugeln (0-4). Die Struktur zeigt nur das selektivitätsfilterbildende Segment in der s. g. "ball-and-stick" Darstellung.

Es gilt als gesichert, dass die Kir-Kanäle aus vier Kir-Untereinheiten zusammengesetzt sind, deren räumliche Anordnung als "inverted tepee" bezeichnet wird. Abbildung 1.1 A zeigt, dass die beiden Transmembransegmente (TM1 und TM2) jeder Untereinheit in Kontakt treten und so zur Struktur des Gesamtproteins beitragen. Das Verbindungsstück zwischen TM1 und TM2 mit der so genannten Porenhelix bildet den Selektivitätsfilter des Kanals. An die Membranpore schließt sich die zytoplasmatische Pore des Kanals an, die von den zytoplasmatischen Teilen des N- und C-Terminus gebildet wird. Die Seitenhelix bezeichnet den proximalen Abschnitt des N-Terminus, der möglicherweise in Kontakt mit der Plasmamembran steht. Es wird angenommen, dass Aminosäuren im letzten Viertel von TM2 im geschlossenen Zustand den intrazellulären Poreneingang blockieren ("gating at the bundle crossing") und sich bei der Porenöffnung durch eine Rotationsbewegung der TM2-Helix aus der Pore bewegen. Weiterhin wird spekuliert, dass die Rotationsbewegung von TM2 und TM1 auch zu Konformationsänderungen in den zytoplasmatischen N- und C-Termini führen (Bichet et al. 2003). An diese zytoplasmatischen Domänen binden verschiedene Liganden wie ATP, Protonen und PIP<sub>2</sub>, deren Interaktionen entweder eine Öffnung (PIP<sub>2</sub>) oder ein Schließen (Protonen, ATP) des Kanals bewirken.

Des Weiteren eröffneten die Kristallstrukturen auch die atomare Struktur des Selektivitätsfilters (Abbildung 1.1 B). Damit konnte auch das Verständnis um den Mechanismus der Kaliumpermeation wesentlich verbessert werden. Das Gly-Tyr-Gly-Motiv innerhalb der Porenhelix konnte eindeutig als selektivitätsfilterbildendes Segment identifiziert werden. Es wird postuliert, dass die Carbonylgruppen des "GYG"-Motivs derart spezifisch zum Kanallinneren hin orientiert werden, dass ausschließlich ein dehydratisiertes K<sup>+</sup>-Ion eine perfekte Koordination erfährt, wenn es den Kanal passiert (Bichet et al. 2003).

Dem weit reichenden Aufgabenspektrum der Kir-Kanäle gerecht werdend, gibt es eine Vielzahl verschiedener Kir-Kanäle, die sich durch Sequenzvergleich in sieben Unterklassen (Kir1.X – Kir7.X) aufteilen (Abbildung 1.2) (Oliver et al. 2000). Die Mitglieder der Unterklassen unterscheiden sich zum einen in der Stärke der Gleichrichtung (starke und schwache Einwärtsgleichrichter) und zum anderen durch die Art der intrazellulären Faktoren die ihre Aktivität regulieren (Baukrowitz und Fakler 2000). So werden z. B. Kir1.X-, Kir4.X- und Kir5.X-Kanäle durch Protonen inhibiert (Schulte et al. 1999), Kir3.X-Kanäle durch  $G_{\beta\gamma}$ -Proteine stimuliert (Logothetis et al. 1987) und Kir6.X-Kanäle werden in ihrer Aktivität durch ATP und ADP reguliert. Des Weiteren wurden langkettige Fettsäure-CoA Ester (Oleoyl-CoA) als Aktivatoren von Kir6.X-Kanälen identifiziert (Larsson et al. 1996).



**Abb.1.2: Dendrogramm der Kir-Kanäle (Oliver et al. 2000).** Die Familie der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle besteht aus 15 Mitgliedern und ist in 7 Unterfamilien gegliedert.

Neben den spezifischen Regulationsmechanismen für bestimmte Kir-Unterklassen ist allen Kanäle gemein, dass sie durch negative Phosphoinositide wie PIP<sub>2</sub> aktiviert werden (Bichet et al. 2003).

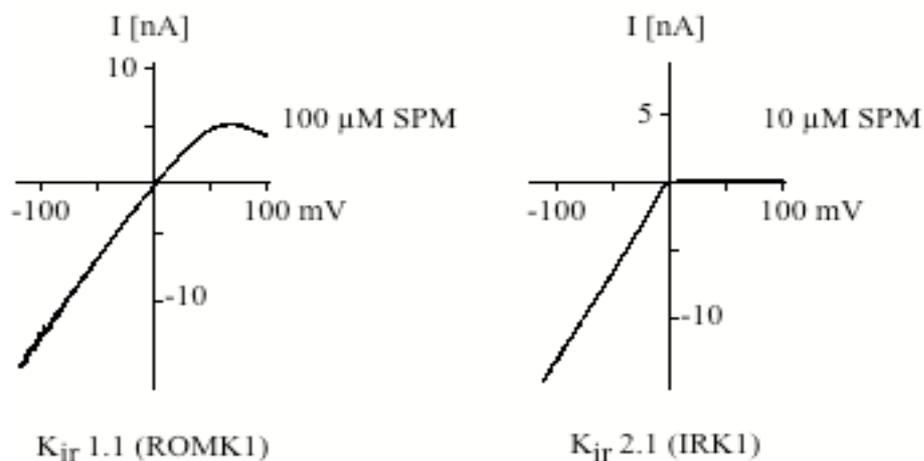
Die verschiedenen Regulationsmechanismen sind zentral für die spezifischen Aufgaben der Kir-Kanäle und Mutationen, die diese Regulationsmechanismen beeinträchtigen, können pathophysiologische Konsequenzen haben. Beispielsweise führt eine verminderte Interaktion zwischen  $\text{PIP}_2$  und Kir-Kanälen zu Krankheitsbildern wie dem Bartter's - oder Andersen's Syndrome (Lopes et al. 2002).

## **1.2. Physiologische Funktion von Kir-Kanälen**

Zellmembranen ruhender Zellen sind nahezu nur für Kaliumionen durchgängig. Daher liegt das Ruhemembranpotential im Bereich des Kaliumgleichgewichtspotentials ( $E_K$ ), welches je nach Zellart einen Wert zwischen -30 mV und -100 mV annehmen kann. In den meisten Zellen sind Kir-Kanäle maßgeblich für die Ausbildung des Ruhemembranpotentials verantwortlich. Änderungen ihrer Aktivität haben aus diesem Grund starke Auswirkungen auf die elektrische Erregbarkeit dieser Zellen.

### **1.2.1. Bedeutung der Einwärtsgleichrichtung**

Die namensgebende Beschreibung "Einwärtsgleichrichter" liegt in der damit bekundeten Haupteigenschaft der Kir-Kanäle begründet. Im Gegensatz zur klassischen Kaliumleitfähigkeit, welche mit Depolarisation zunimmt, besitzen Kir-Kanäle ein anomales Strom-Spannungsverhalten (Abbildung 1.3).



**Abb.1.3: Strom- Spannungskennlinie für verschiedene Kir-Kanäle.** Die intrazelluläre Applikation von SPM (Spermin) zeigt, dass Kir1.1-Kanäle (links) zu den schwachen - , beziehungsweise Kir2.1-Kanäle (rechts) zu den starken Einwärtsgerichtern zählen.

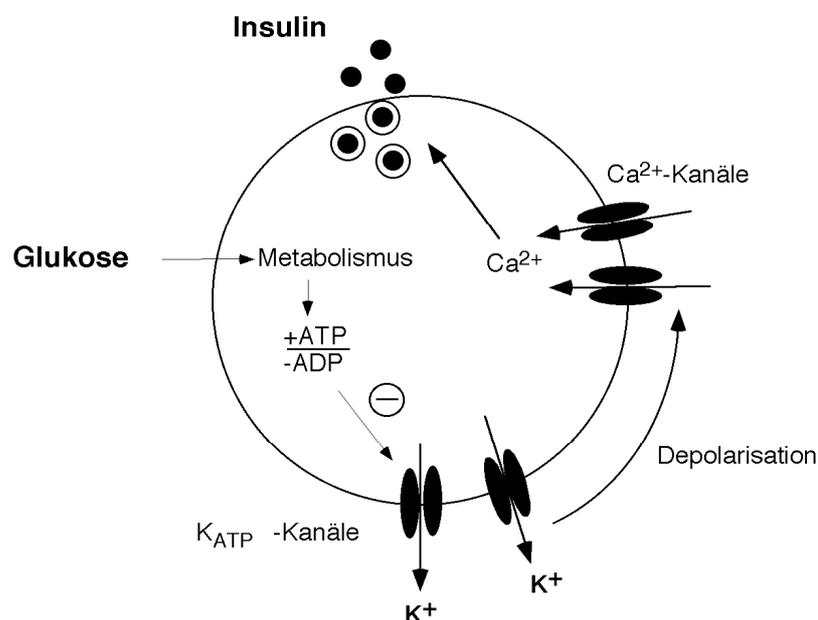
Kir-Kanäle zeigen eine hohe Leitfähigkeit bei negativen Membranpotentialen (im Bereich des Kaliumgleichgewichtspotentials), welche mit Membrandepolarisation stark abnimmt. Dies bedeutet, dass Kir-Kanäle einen stabilisierenden Effekt auf das Ruhemembranpotential ausüben, aber einer Depolarisation wenig entgegenwirken. Der Grad der Einwärtsgerichtung variiert innerhalb der Kir-Familie, so dass man eine Einteilung in schwache und starke Einwärtsgerichter erstellen kann. Wie auch aus Abbildung 1.3 ersichtlich, gehört Kir2.1 (und alle Vertreter von Kir2.X und Kir3.X) zu den starken Einwärtsgerichtern und Kir1.1 (daneben noch Kir4.X, Kir5.X, Kir6.X, und Kir7.X) zu den schwachen Einwärtsgerichtern. Für die physiologische Funktion der Kanäle ist der Unterschied von entscheidender Bedeutung, so werden starke Einwärtsgerichter insbesondere in erregbaren Zellen exprimiert. Beispielsweise legen Kir2.1-Kanäle den Schwellenwert zur Auslösung eines Aktionspotentials im Herzen fest, da sie ab einem definierten Membranpotential die Aktivierung spannungssensitiver Na<sup>+</sup>-Kanäle nicht mehr verhindern können. Andererseits sind Kir1.1-Kanäle an der luminalen Sekretion von K<sup>+</sup> in der Niere beteiligt, wobei die schwache Einwärtsgerichtung einen K<sup>+</sup>-Auswärtsstrom (Sekretion) ermöglicht. Als Mechanismus ist heute allgemein

anerkannt, dass die Einwärtsgleichrichtung auf einer spannungssensitiven Blockade der Pore durch die intrazellulären Kationen  $Mg^{2+}$ , Spermin (SPM) und Spermidin (SPD) basiert (Fakler et al. 1995). Bei positiven Membranspannungen werden die mehrfach positiv geladenen Ionen aufgrund des elektrischen Feldes in die Pore hineingezogen (Oliver et al. 2000). Der unterschiedliche Grad der Gleichrichtung ist im Wesentlichen darin begründet, dass starke Gleichrichter eine negativ geladene Aminosäure in der Kanalpore besitzen (z. B. Kir2.1 D172), welche die Bindung der blockierenden Ionen stabilisiert. Hingegen schwache Einwärtsgleichrichter besitzen an der homologen Position eine neutrale Aminosäure, z. B. Kir6.2 N160 (Fakler et al. 1995).

### **1.2.2. $K_{ATP}$ -Kanäle als metabolische Sensoren für die Insulinsekretion in pankreatischen $\beta$ -Zellen**

$K_{ATP}$ -Kanäle (Kir6.1/Kir6.2 + SUR1/2) werden als einzige Mitglieder der Kir-Familie mit einer Sulfonylharnstoff-Rezeptor-Untereinheit (SUR) assoziiert, welche die Eigenschaften der  $K_{ATP}$ -Kanäle moduliert. Es ist bekannt, dass die SUR-Untereinheit die Empfindlichkeit gegenüber intrazellulärem ATP erhöht und eine Kanalaktivierung durch ADP vermittelt (Tucker et al. 1997). Die Aktivität der  $K_{ATP}$ -Kanäle ist an den metabolischen Zustand der Zelle gekoppelt, welcher sich in dem Verhältnis von ATP zu ADP widerspiegelt (Seino et al. 1999). Eine Erhöhung des Blutglukosespiegels führt zu einer erhöhten Aufnahme und Metabolisierung von Glukose in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Es kommt zu einem Anstieg der ATP-Konzentration und zu einem Abfall der ADP-Konzentration. Dies bedingt die Inhibition von  $K_{ATP}$ -Kanälen und führt damit zu einer Destabilisierung des Ruhemembranpotentials. Die zunehmende Depolarisation

aktiviert spannungsgesteuerte Kalziumkanäle und die massive Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration resultiert letzten Endes in einer Freisetzung von Insulin in die Blutbahn (Abbildung 1.4) (Baukrowitz und Fakler 2000). Das Hormon Insulin wiederum bewirkt, über eine verstärkte Aufnahme von Glukose in Leber- und Muskelzellen, eine Senkung des Blutglukosespiegels. Damit vermindert sich das intrazelluläre Verhältnis von ATP zu ADP und die  $K_{ATP}$ -Kanäle werden aktiviert. Das Ruhemembranpotential der Zelle wird wieder hergestellt (Ashcroft et al. 1988).



**Abb.1.4: Die Rolle des  $K_{ATP}$ -Kanals für die Insulinsekretion in  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Baukrowitz und Fakler 2000).**

Die zentrale Bedeutung des  $K_{ATP}$ -Kanals für die Insulinsekretion eröffnete die Möglichkeit der gezielten pharmakologischen Beeinflussung in der Behandlung von Diabetes mellitus Typ II. Pharmaka vom Typ der Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid stellen potente Inhibitoren des  $K_{ATP}$ -Kanals dar und begünstigen daher die Insulinsekretion, was die Erniedrigung des bei Diabetespatienten chronisch erhöhten Blutglukosespiegels zur Folge hat (Trube et al. 1986).

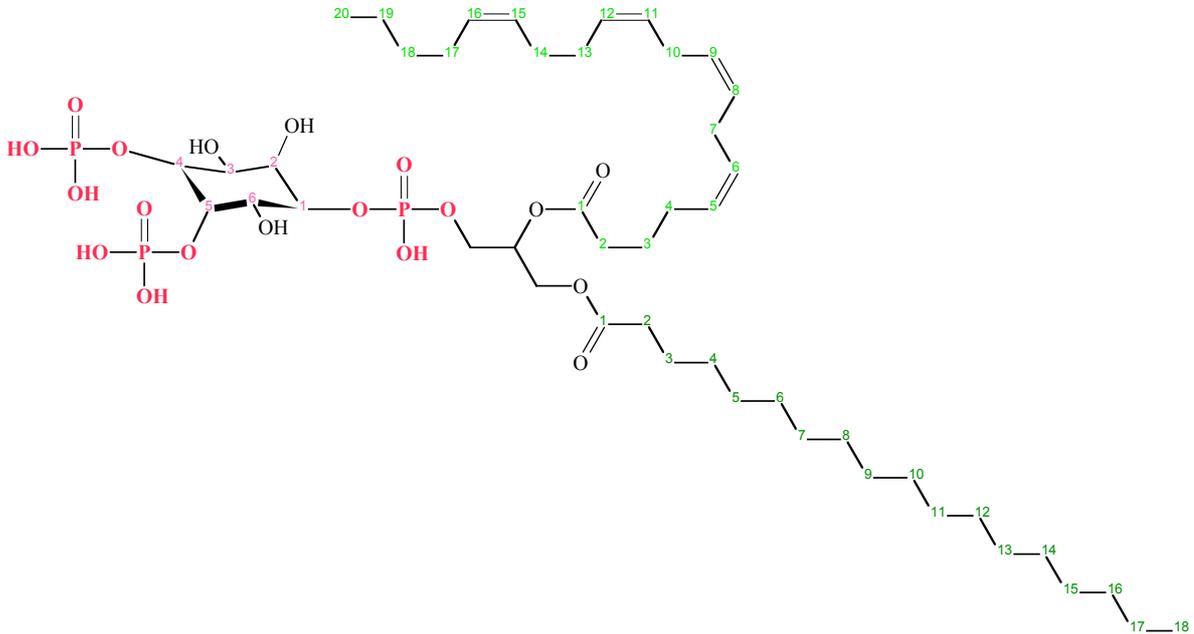
### **1.3. Lipid-Regulation von Kir-Kanälen**

Zahlreiche Ionenkanäle können durch Phosphoinositide (= Phospholipide) wie PIP<sub>2</sub> in ihrer Aktivität moduliert werden (Hilgemann et al. 2001). Im Falle der hier untersuchten Kir-Kanäle gilt die stimulierende Wirkung von PIP<sub>2</sub> als etabliert. Interessanterweise konnten wir vor kurzem zeigen, dass auch Ester langkettiger Fettsäuren mit CoA (z. B. Oleoyl-CoA), mit der Phosphoinositidbindungsstelle des Kir6.2-Kanals interagieren (Schulze et al. 2003b).

#### **1.3.1. Struktur und Stoffwechsel von Phosphoinositiden**

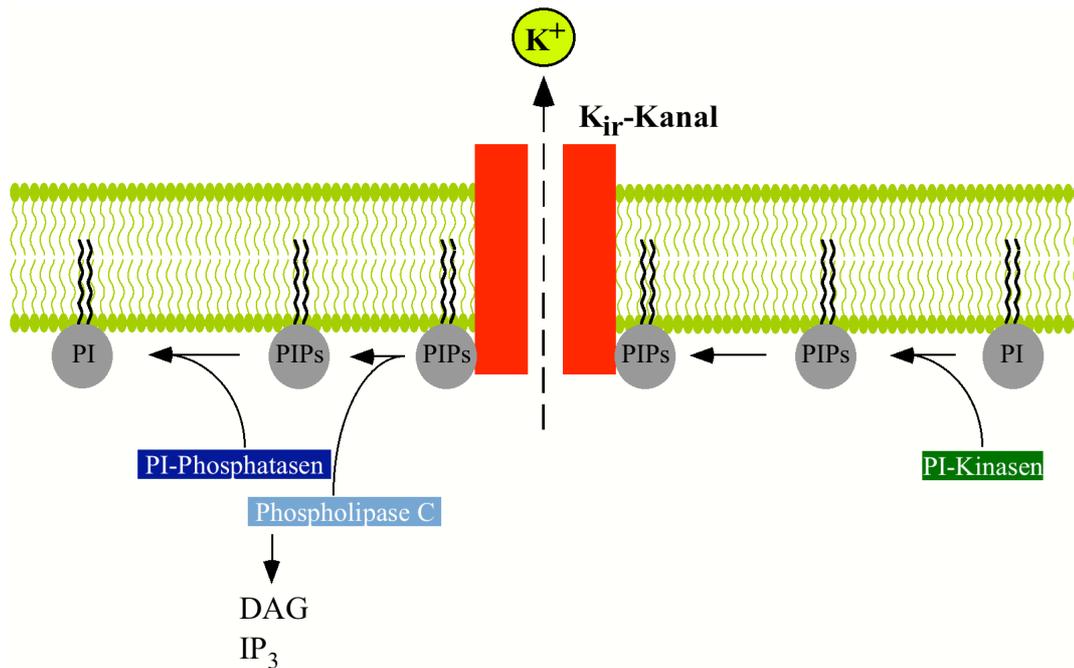
Phosphoinositide sind Bestandteile von Zellmembranen, deren Konzentrationen durch die Enzyme des Phosphoinositidmetabolismus kontrolliert werden. Das physiologisch bedeutendste Phosphoinositid ist PI(4,5)P<sub>2</sub> (Abbildung 1.5), das im Allgemeinen als PIP<sub>2</sub> bezeichnet wird, und einen Anteil von etwa 2 % der Gesamtlipidmenge einnimmt (Fruman et al. 1998). Es wird angenommen, dass das Erregungsverhalten von erregbaren Zellen (Neurone, endokrine Zellen, Myozyten) durch zeitlich-räumliche Änderungen der Phosphoinositid-Konzentration moduliert wird. Neben Phosphatidylinositol-4,5 bisphosphat, existieren noch die Derivate PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub> und PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, welche aber in einer geringeren Konzentration vorliegen. Das Phosphoinositidmolekül setzt sich aus einem Fettsäureanteil und einer Phosphat- Kopfgruppe zusammen. Der hydrophobe Molekülteil besteht aus einem Arachidonoyl- (all-cis 5,8,11,15 Eicosatetraensäure; C20:4) und einem

Stearoylrest (Octadecansäure; C18:0) die über ein Glycerolphosphat mit dem hydrophileren Inositolring verbunden sind.



**Abb. 1.5: Struktur von Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>).**

Die Phosphatidylinositolderivate entstehen durch Phosphorylierung beziehungsweise Dephosphorylierung der Hydroxygruppen des Inositolringes durch PI-Kinasen und PI-Phosphatasen. Des Weiteren werden Phosphoinositide, als Substrat der Phospholipase C, in IP<sub>3</sub> und DAG gespalten (Abbildung 1.6). Diese Mechanismen ermöglichen es Zellen ihre Zusammensetzung an Phosphoinositiden äußeren Bedingungen anzupassen und deuten in Richtung einer möglichen Regulation von Kir-Kanälen durch eine Vielzahl unterschiedlicher Signaltransduktionsmechanismen. Der Phosphoinositidmetabolismus wird u. a. durch G-Proteine und Tyrosinkinase gesteuert. Folglich resultiert die Stimulation von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR) und Tyrosinkinase-Rezeptoren, durch z. B. Zytokine oder Wachstumsfaktoren, in einer Änderung der Phosphoinositidkonzentration (insbesondere von PIP<sub>2</sub>) in der Membran.



**Abb. 1.6: Phosphoinositidmetabolismus.** Die aktivierende Wirkung der Phosphoinositide auf Kir-Kanäle wird durch PI-Kinasen, PI-Phosphatasen und Phospholipase C reguliert.

### 1.3.1.1. Modulation der Kir-Kanalaktivität durch Phosphoinositide

Alle Mitglieder der Kir-Familie zeigen nach Exzision eines Membranstücks („Patch“) die Tendenz zu einem allmählichen Verlust der Stromamplitude. Dieses Phänomen wird als „run-down“ bezeichnet, dessen Ursache vermutlich mit einem Abbau von PIP<sub>2</sub> durch die im Patch enthaltenen Phosphatasen und Lipasen begründet werden kann. Diese spontane Kanal-Inaktivierung kann durch kurzzeitige intrazelluläre Applikation von PIP<sub>2</sub> rückgängig gemacht werden (Baukrowitz et al. 1998; Huang et al. 1998, Fan und Makielski 1997). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die verschiedenen Kir-Kanäle eine unterschiedliche Affinität und Spezifität für die verschiedenen Phosphoinositide aufweisen. So verfügen Kir6.2-, Kir1.1- und Kir3.1-Kanäle über eine geringere PIP<sub>2</sub>-Affinität als Kir2.1-Kanäle und sprechen deshalb insbesondere auf

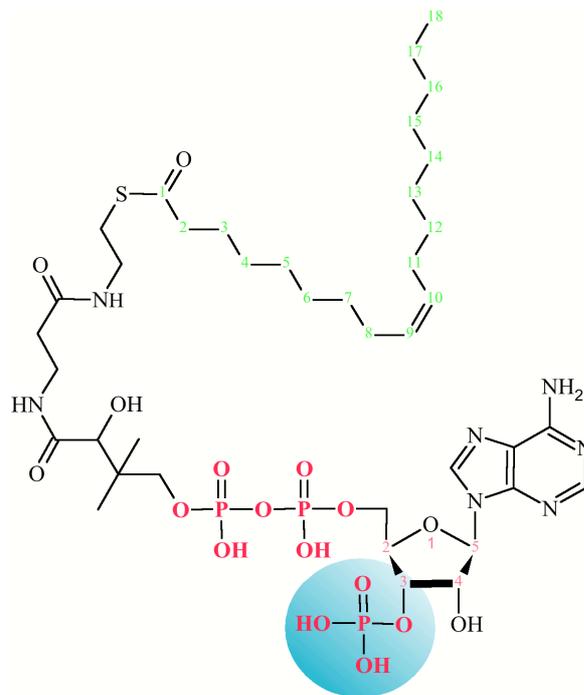
Veränderungen der Konzentration von Phosphoinositiden in der Plasmamembran an. Kir2.1-Kanäle besitzen auch die größte Phosphoinositidspezifität und binden PI(4,5)P<sub>2</sub> deutlich besser als z. B. PI(3,4)P<sub>2</sub> oder PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. K<sub>ATP</sub>-Kanäle weisen hingegen die geringste Phosphoinositidspezifität auf und werden daher auch durch andere Membranlipide wie Fettsäure-CoA-Ester (z. B. Oleoyl-CoA) aktiviert (Rohacs et al. 2003). Gegenwärtig ist jedoch unklar inwieweit die Spezifitätsunterschiede physiologisch relevant sind.

Es gilt als etabliert, dass Kir-Kanäle nur in Anwesenheit von PIP<sub>2</sub> aktiv sind, wobei der Grad der Aktivität durch den Phosphoinositid-Stoffwechsel reguliert wird (siehe Seite 17) (Kobrinisky et al. 2000, Xie et al. 1999). Die physiologische Bedeutung dieser Regulation wird u. a. auch dadurch hervorgehoben, dass Mutationen in Kir-Kanälen, welche die Phosphoinositid-Interaktion vermindern, zu Krankheitsbildern wie z. B. dem Andersen's Syndrome führen (Lopes et al. 2002). Diese angeborene Funktionsstörung des Kir2.1-Kanals, der insbesondere im Herzen und in Skelettmuskeln exprimiert wird, äußert sich in einer verlängerten QT-Zeit und wird von ventrikulären Arrhythmien begleitet. Des Weiteren wurden bei dem resultierende Krankheitsbild periodische Paralysen und skelettale Dismorphien beobachtet (Plaster et al. 2001).

### **1.3.2. Struktur und Stoffwechsel von LC-CoA Estern**

Neben Phosphoinositiden scheinen auch Zwischenprodukte des Fettsäurestoffwechsels in die Regulation von Kir-Kanälen involviert zu sein. Neben Larsson et al. konnten auch andere Autoren zeigen, dass Ester langkettiger Fettsäuren (hier Ölsäure) mit Coenzym A (CoA), wie z. B. Oleoyl-CoA, auch zur Aktivierung von

$K_{ATP}$ -Kanälen befähigt sind (Larsson et al. 1996, Gribble et al. 1998). Die molekulare Struktur von Oleoyl-CoA ähnelt der Struktur von  $PIP_2$ , das Molekül besitzt eine hydrophile Kopfgruppe mit Phosphatresten und eine hydrophobe Fettsäureseitenkette, die als Membrananker dienen könnte (Abbildung 1.7).



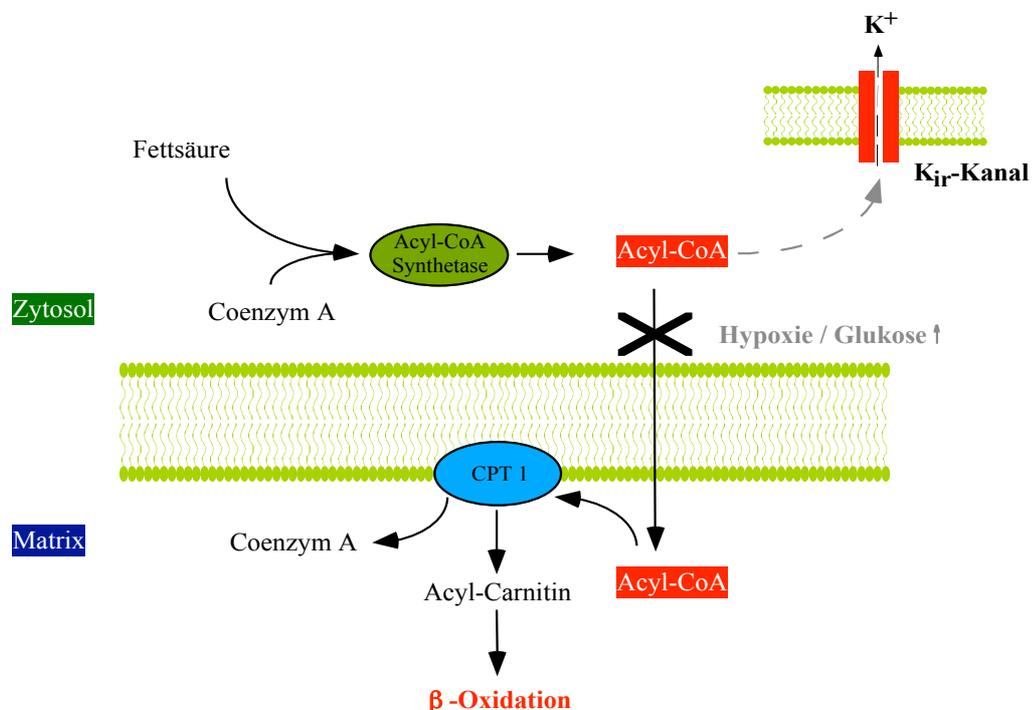
**Abb. 1.7: Struktur des Oleoyl-CoA Moleküls.**

Bei Oleoyl-CoA besteht die Fettsäureseitenkette aus einer Ölsäure (cis-9-Octadecensäure, C18:1). Die hydrophile CoA-Kopfgruppe verfügt über ein Adenosin-3'-phosphat, welche über ein Panthotensäurerest und einem  $\beta$ -Mercaptoethylaminrest mit der Fettsäure verbunden ist. Dabei sind zwei Phosphate in der Panthotensäure eingebunden, eine weitere Phosphatgruppe befindet sich an Position drei des Riboseringes (3'-Ribosephosphatgruppe) und ist hier durch einen Kreis hervorgehoben.

Fettsäuren (Fette) stellen das wichtigste Energiespeichermedium für Stoffwechselenergie dar. Die Rückgewinnung der gespeicherten Energie erfolgt über die  $\beta$ -Oxidation in den Mitochondrien. Die am häufigsten vorkommenden Fettsäuren sind

solche mit 16 bzw. 18 Kohlenstoffatomen, dabei können die Moleküle eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Die Resorption von Fettsäuren erfolgt im Dünndarm, wo sie als Chylomikronen über das Lymphsystem in die Blutbahn abgegeben werden. Neben der exogenen Aufnahme können Fettsäuren auch durch die s. g. "de-Novo" Synthese bereitgestellt werden. Die Verteilung im Organismus erfolgt als Lipoproteine, bei denen die Fettsäuren an Proteine (Hauptsächlich Albumin) gebunden werden. Für die Aufnahme der Fettsäuren in die Zellen wird neben dem Mechanismus einer freien Diffusion noch ein proteinvermittelter Transmembrantransport für langkettige Fettsäuren diskutiert (Abumrad et al. 1998). Um für die  $\beta$ -Oxidation zur Verfügung zu stehen, müssen die Fettsäuren die Mitochondrienmembran passieren. Dazu werden langkettige Fettsäuren durch das Enzym Acyl-CoA-Synthetase an Coenzym A gebunden. Die entstehenden Fettsäure-CoA-Ester werden durch die Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT1) auf Carnitin übertragen und stellen so die Transportform der Fettsäuren zum Eindringen in die Mitochondrien dar. Die  $\beta$ -Oxidation baut Acyl-CoA zu Acetyl-CoA ab, welches anschließend dem Zitratzyklus zugeführt wird. Die entstehenden Reduktionsäquivalente werden auf NAD und FAD übertragen und in der Atmungskette zur Energiegewinnung oxidiert. Unter hypoxischen Bedingungen kommt es zu einem Anstau von  $\text{NADH}_2$  und  $\text{FADH}_2$ , da diese aufgrund des Sauerstoffmangels nicht oxidiert werden können. Die  $\beta$ -Oxidation wird unterbunden, was mit einem Anstieg der intrazellulären Acyl-Coenzym A Konzentration einhergeht (Löffler und Petrides 2002). Ein anderer Mechanismus, der die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren verhindert, ist die physiologische Inhibition von CPT1 durch Malonyl-CoA. Diese Hemmung verhindert den Transport der Fettsäuren in die Mitochondrien und entzieht sie somit der  $\beta$ -Oxidation. Ein Teil des anfallenden Acetyl-CoA wird als Zitrat wieder aus den Mitochondrien herausgeschleust und über das Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) in

Malonyl-CoA umgewandelt. In Situationen wenn ausreichend “Brennstoff“ vorhanden ist, etwa bei erhöhten Glukosespiegeln, kommt es vermehrt zur Bildung vom Malonyl-CoA. Die Hemmung von CPT1 durch Malonyl-CoA bedingt somit einerseits eine verstärkte Metabolisierung von Glukose, andererseits können Fettsäuren nicht in die Mitochondrien gelangen (Sugden und Holness 1994), was wahrscheinlich mit einem Anstieg der intrazellulären Konzentration von Acyl-CoA einhergeht. Diese Vermutungen werden durch Untersuchungen von Bränström et al. unterstützt. Es konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Gabe von Glukose und Fettsäuren (in diesem Fall Ölsäure) auf die extrazelluläre Seite pankreatischer  $\beta$ -Zellen, wahrscheinlich über Bildung von intrazellulärem Oleoyl-CoA, zur Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen führt. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die verminderte Insulinsekretion bei Diabetikern möglicherweise auf die chronisch erhöhten Blutglukosewerte zurückgeführt werden kann (Abbildung 1.8) (Bränström et al. 2004).



**Abb. 1.8: Vereinfachte Darstellung des Transports langkettiger Fettsäuren durch die Mitochondrienmembran zum Ort der  $\beta$ -Oxidation.** Unter hypoxischen Bedingungen oder einem Zustand erhöhter Blutglukosewerte kommt es zur intrazellulären Akkumulation von Acyl-CoA-Estern, welche die Regulation der Kir-Kanalaktivität beeinflussen.

### 1.3.2.1. Modulation der $K_{ATP}$ -Kanalaktivität durch LC-CoA

Es gilt als gesichert, dass LC-CoA und  $PIP_2$  an die Kir6.1/6.2-Untereinheit binden um eine Aktivierung der  $K_{ATP}$ -Kanäle zu erzeugen (Tucker et al. 1997, Gribble et al. 1998, Schulze et al. 2003b). Für die Potenz der Wirkung von LC-CoA scheint der Anteil der hydrophoben Fettsäureseitenkette von großer Bedeutung zu sein. Manning Fox et al. konnten zeigen, dass eine Verlängerung der Fettsäureseitenkette zu einer gesteigerten Fähigkeit führt, die ATP-Empfindlichkeit von  $K_{ATP}$ -Kanälen zu reduzieren. So resultierte beispielsweise die Inkubation mit Octanoyl-CoA (C8:0-CoA) im Vergleich zu Palmitoyl-CoA (C16:0-CoA) in einer wesentlich schwächeren Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen (Manning Fox et al. 2003). Die Bedeutung der Phosphatgruppen der hydrophilen Kopfgruppe für die Effekte an Kir-Kanälen wurde bisher noch nicht untersucht. Der Mechanismus der Wirkung von LC-CoA auf  $K_{ATP}$ -Kanäle wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es wurde ein zu  $PIP_2$  unterschiedlicher Wirkmechanismus beschrieben, obwohl umfassende Parallelen zur  $PIP_2$ -Aktivierung (u. a. Schulze et al. 2003b) aufgezeigt wurden. Diese Annahme beruht größtenteils darauf, dass andere Vertreter der Kir-Kanäle durch Oleoyl-CoA nicht aktiviert werden (Gribble et al. 1998, Liu et al. 2001). Nach Rohacs et al. basiert die fehlende Aktivierung anderer Kir-Kanäle auf dem schon erwähnten Konzept der Phosphoinositidspezifität (siehe Seite 19), so dass vermutlich doch von einem gleichen Wirkmechanismus von  $PIP_2$  und LC-CoA auf  $K_{ATP}$ -Kanäle ausgegangen werden kann (Rohacs et al. 2003). Diese Annahme konnte auch innerhalb der vorliegenden Arbeit bekräftigt werden, wir postulieren, dass  $PIP_2$  und Oleoyl-CoA die Aktivität des  $K_{ATP}$ -Kanals über die gleiche Bindungsstelle regulieren (Schulze et al. 2003b).

Ein kontinuierlich erhöhter Fettsäurespiegel, z. B. bei Adipositas führt zu einer erhöhten Konzentration an intrazellulärem LC-CoA. Die damit verbundene Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen in pankreatischen  $\beta$ -Zellen würde durch die Stabilisierung des Membranpotentials einer Insulinsekretion entgegenwirken, was möglicherweise die Entwicklung eines Diabetes mellitus vom Typ II begünstigen würde (Bränström et al. 2004). In Kardiomyozyten führt ein ATP-Abfall, z. B. unter Ischämie, zu einer Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen (Benndorf et al. 1992). Diese Bedingungen würden ebenso zum Unterbrechen der  $\beta$ -Oxidation führen, was möglicherweise mit einem Konzentrationsanstieg von LC-CoA einhergeht. Die damit verbundene Stimulation von  $K_{ATP}$ -Kanälen würde eine Zelldepolarisation vermindern und so ein Einströmen von Kalzium reduzieren. Dieser Mechanismus würde die Überlebenszeit von Herzmuskelzellen unter ischämischen Stress verlängern und eine physiologische Relevanz begründen (Liu et al. 2001). Störungen der  $O_2$ -Versorgung des Gewebes (Hypoxie/ Ischämie) können z. B. auf eine verminderte Organdurchblutung durch Thrombose, Embolie oder Arteriosklerose zurückgeführt werden. Der Anstieg der intrazellulären Konzentration von LC-CoA ist folglich an den energetischen/ metabolischen Zustand der Zelle gekoppelt und stellt einen alternativen Mechanismus zur Regulation der Aktivität von Kir-Kanälen dar.

#### **1.4. Kalium-Inaktivierung von Kir1.1-Kanälen**

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Kir1.1-Kanälen versucht, die der Lipidregulation zugrunde liegenden Vorgänge am Kanalprotein zu

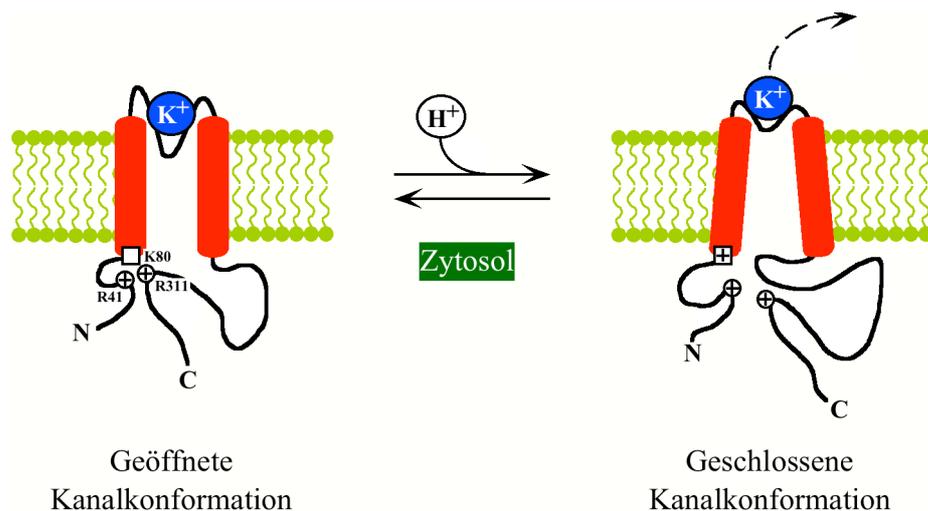
beschreiben. Daher sollen Kir1.1-Kanäle, die auch als ROMK-Kanäle (Renal Outer Medulla Potassium (K) Channels) bezeichnet werden, kurz eingeführt werden.

Kir1.1-Kanäle werden vor allem im dicken aufsteigenden Teil der Henle Schleife und in den Hauptzellen des Sammelrohrs der Niere exprimiert. Die Hauptaufgabe besteht in der Aufrechterhaltung einer konstanten Kaliumkonzentration im Extrazellulärraum (Wang et al. 1992). Die Offenwahrscheinlichkeit der Kir1.1-Kanäle wird neben  $\text{PIP}_2$  auch durch den intrazellulären pH-Wert reguliert. Ein Anstieg der intrazellulären Protonenkonzentration führt zu einer reversiblen Inhibition der Aktivität dieser Kanäle (Fakler et al. 1996). Auch scheinen die Proteinkinasen A und C in die Regulation von Kir1.1-Kanälen involviert zu sein (Herbert 1995; Xu et al. 1996).

Im dicken aufsteigenden Teil der Henle Schleife in der Niere werden Kaliumionen über Kir1.1-Kanäle in das Lumen der Tubuli abgegeben und zusammen mit  $\text{Na}^+$  ( $2\text{Cl}^-$ ) über den  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ -Kotransporter wieder in die Zellen zurückgeführt. In den Hauptzellen des Sammelrohrs besitzen Kir1.1-Kanäle eine ähnliche Funktion, nach der  $\text{K}^+$ -Sekretion schließt sich eine  $\text{Na}^+$ -Rückresorbtion über die epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanäle (ENaC = epithelial Sodium (Na) channels) an. Angeborene Funktionsstörungen des Kir1.1-Kanals führen zu einer verminderten Kaliumsekretion und somit zu einer Abnahme der Triebkraft für die  $\text{Na}^+$ -Rückresorbtion. Der resultierende Verlust von Salz und Flüssigkeit ist von einer metabolischen Alkalose begleitet und kann zu einer Nephrokalzinose führen. Dieses Krankheitsbild wird unter dem Begriff Bartter's Syndrome zusammengefasst, wobei es sich bei den Betroffenen meist um Frühgeborene handelt, die eine schwere Dehydration in den ersten Lebensmonaten zeigen (Abraham et al. 1999).

Die Regulation von Kir1.1-Kanälen durch intrazelluläre pH-Werte erfolgt im physiologischen Bereich um pH 7. Der auch als "pH-Gating" bezeichnete Vorgang wird

in Kir1.1-Kanälen durch die Protonierung eines Lysinrestes (K80) im proximalen N-Terminus eingeleitet. Der pH-Sensor befindet sich in unmittelbarer räumlicher Nähe zum Arginin 41 (R41) im N-Terminus und wurde zusammen mit dem Arginin 311 (R311) im C-Terminus als hoch konserviert für pH-empfindliche Kir-Kanäle identifiziert. Diese s. g. “RKR-Triade“ scheint durch elektrostatische Interaktionen zwischen N- und C-Terminus über die pH-Empfindlichkeit der Kanäle zu entscheiden. Mutationen an den beschriebenen Positionen, z. B. K80M in Kir1.1, führen zu einer dramatischen Änderung der pH-Empfindlichkeit. Die Interaktion intrazellulärer Proteinabschnitte wurde ebenfalls durch Modifizierung von Cysteinen im Kir1.1-Kanal bestätigt. Schulte et al. konnten zeigen, dass die Cysteine 49 und 308 nur im geschlossenen Zustand einer Modifizierung zugänglich waren. Beide Cysteine befinden sich in der Nähe der Arginine 41 und 311 der “RKR-Triade“, so dass angenommen werden kann, dass die pH-Inaktivierung strukturelle Änderungen der “RKR-Triade“ erzeugt und so die Regulation von Kir1.1-Kanälen durch intrazelluläre pH-Wert Änderungen vermittelt (Abbildung 1.9) (Schulte et al. 1998, Schulte et al. 1999).



**Abb. 1.9: Arbeitsmodell zur Regulation von Kir1.1-Kanälen.** Die ständig positiv geladenen Arginine 41 und 311 sind mittels Kreisen dargestellt, der pH-Sensor Lysin 80 ist als Rechteck angedeutet. Änderungen des intrazellulären pH-Wertes werden durch Konformationsänderungen der RKR-Triade vermittelt und beeinflussen die Wechselwirkung zwischen extrazellulärem Kalium und der Porenregion des Kir1.1-Kanals.

Neben der Regulation durch Protonen, wird die Aktivität von Kir1.1-Kanälen auch durch die Konzentration an extrazellulärem Kalium entscheidend beeinflusst. Die Abwesenheit von extrazellulären Kaliumionen führt zu einer Abnahme der Kanalaktivität, wobei dieser Effekt durch erneutes Zufügen von Kaliumionen umgekehrt werden kann. Dieser als "Kalium-Inaktivierung" bezeichnete Vorgang erfolgt im Bereich physiologischer Kaliumkonzentrationen (3,5-5 mM K<sup>+</sup>) und ist interessanterweise an den intrazellulären pH-Wert gekoppelt. Eine Abnahme der extrazellulären Kaliumkonzentration führt zu einer erhöhten pH-Empfindlichkeit. Außerdem konnten Doi et al. zeigen, dass die Überführung von Porenabschnitten des pH-unempfindlichen Kir2.1-Kanals in Kir1.1-Kanäle zur Aufhebung der Kalium-Inaktivierung führt, ohne die Empfindlichkeit gegenüber intrazellulären pH-Werten zu ändern (Doi et al. 1996). Sich anschließende Untersuchungen zeigten, dass die Kalium-Inaktivierung von Kir1.1-Kanälen durch Mutationen in der Porenregion (L136I und V140T) aufgehoben werden kann. Es wird angenommen, dass der Selektivitätsfilter Teil der Gating-Maschinerie ist, die zum Verschluss des Kanals führt. Nach Protonierung des pH-Sensors kommt es zu Konformationsänderungen im zytoplasmatischen N- und C-Terminus die von strukturellen Bewegungen im Bereich der Porenregion begleitet werden. Die Anwesenheit von extrazellulärem Kalium scheint dabei einen Verlust der Kanalaktivität zu verhindern (Abbildung 1.9) (Schulte et al. 2001).

## 2. Aufgabenstellung

Die Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen durch LC-CoA gilt als etabliert und konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt werden (Larsson et al. 1996, Gribble et al. 1998, Manning Fox et al. 2003, Schulze et al. 2003b). Die Wirkung auf andere Vertreter der Kir-Familie wurde bisher noch nicht systematisch untersucht und ist Gegenstand dieser Arbeit.

Als Stoffwechselprodukte des Fettsäuremetabolismus werden LC-CoA in der  $\beta$ -Oxidation verbraucht. Krankheitsbilder wie Diabetes Typ II oder Adipositas führen wegen erhöhter Blutglukose - beziehungsweise Fettsäurespiegel auch zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentrationen an LC-CoA. In diesem Zusammenhang wird eine physiologische Regulation der  $K_{ATP}$ -Kanäle in pankreatischen  $\beta$ -Zellen durch LC-CoA vermutet (Bränström et al. 2004). Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Annahme, dass eine erhöhte Konzentration an LC-CoA neben dem  $K_{ATP}$ -Kanal möglicherweise auch andere Kir-Kanäle regulieren könnte.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Mutagenese und cRNA-Synthese**

Die in dieser Arbeit verwendeten Kanäle beziehen sich auf die folgenden Ausgangsklone: Ratte-Kir1.1 (Acc. Nr. NM\_017023); Ratte-Kir2.1 (Acc. Nr. NM\_008425); Maus-Kir3.4 (Acc. Nr. MMU\_33631); Maus-Kir6.2 (Acc. Nr. NM\_0313583); Maus-SUR2A (Acc. Nr. AF003531); Mensch-Kir7.1 (Acc. Nr. NM\_002242). Die Mutantenkonstrukte wurden durch "site directed mutagenesis" mit Hilfe der PCR-Technik hergestellt und durch Sequenzierung überprüft. Zur Expression in Oozyten wurden die PCR-Konstrukte in einen pBF-Expressionsvektor subkloniert (Fakler et al. 1995). Die Synthese der cRNA erfolgte mittels einem RNA-polymerase Kit (Ambion, Austin (TX), USA), die bis zur Injektion bei -80°C aufbewahrt wurde.

#### **3.2. Oozytenpräparation und Expression**

Die Entnahme der Oozyten erfolgte nach Betäubung mittels Tricain chirurgisch aus adulten *Xenopus laevis*. Die Frösche wurden höchstens vier Mal verwendet, wobei zwischen den einzelnen Operationen ein Zeitraum von mindestens zwölf Wochen bestand. Nach Behandlung mit Kollagenase wurden die Oozyten manuell vereinzelt und defollikuliert. Zur Injektion kamen nur Oozyten vom Reifestadium IV nach Dumont (Dumont 1972). Spätestens 24 Stunden nach Entnahme der Oozyten wurden diese mit zirka 50 nl cRNA injiziert und bis zu den Experimenten im Brutschrank bei 18°C bereitgehalten. Die Untersuchungen erfolgten zwischen 24 Stunden und zehn Tagen nach der Injektion. Direkt vor den Experimenten wurde die jeweilige Oozyte manuell von

ihrer Vitellinmembran befreit um freien Zugang zur Zellmembran zu schaffen. Die Oozyten wurden während der gesamten Zeit in Barth Medium aufbewahrt, beziehungsweise die Kanäle Kir1.1, Kir2.1, Kir3.4\_S143T, Kir4.1 und Kir7.1 in einem modifiziertem Barth Medium welches als "Testlösung" bezeichnet wurde (siehe 3.4).

### **3.3. Elektrophysiologie**

Die Experimente wurden unter Voltage Clamp Bedingungen bei Raumtemperatur (20°C-24°C) durchgeführt. Als heterologes Expressionssystem dienten bei allen Experimenten *Xenopus laevis* Oozyten. Die Oozyte befand sich in einer Art Kammer gefüllt mit  $K_{\text{Bad}}$ -Lösung oberhalb der Objektive des Mikroskops (Zeiss Axiovert 25, Carl-Zeiss, Jena, Deutschland). Diese wurde mittels zwei Deckgläschen erzeugt, und ein kontinuierlicher Lösungswechsel wurde durch eine entsprechende Zulauf- und Absauggeschwindigkeit eingestellt. Außerdem ragte in die Kammer ein Applikationssystem (Multibarrelsystem) hinein. Dieses Multibarrelsystem bestand aus mehreren nebeneinander liegenden kleinen Röhren und war relativ zum Patch beweglich. Die Bewegung der Kammer erfolgte mittels eines Mikromanipulators der Firma Luigs-Neumann (SM1, Luigs-Neumann, Ratingen, Deutschland). Mit dem Multibarrelsystem konnten verschiedene Substanzen auf die zytoplasmatische Seite der Zellmembran appliziert werden. Alle diese Substanzen waren in magnesiumfreier  $K_{\text{Bad}}$  gelöst. Die Pipetten für die "giant-patch-clamp" Experimente wurden aus Borosilikatglas (Durchmesser 2:1 mm) mittels eines Mikropipettenpullers (Model P-97, Sutter Instruments, Novato (CA), USA) ausgezogen und anschließend mit einem heißen Platindraht poliert. Die Pipettenwiderstände betragen 400-700 k $\Omega$ , was einem Durchmesser von etwa 20–40  $\mu\text{M}$  entspricht. Für die "giant-patch" Experimente wurden

die Pipetten vor dem Befüllen mit Pipettenlösung (siehe 3.4) kurz in Paraffinöl getaucht um eine optimale Ankopplung an die Zellmembran zu gewährleisten. Die Durchführung der Experimente erfolgte immer in der s. g. "inside-out" Konfiguration. Die Spannungen und Ströme wurden mit einem EPC9 Verstärker (HEKA Electronics, Lambrecht, Deutschland) aufgenommen und mit einem Bessel Filter mit 3 kHz gefiltert. Das Haltepotential betrug  $-80$  mV und die Aufnahme Frequenz  $0,1$  kHz.

### 3.4. Verwendete Lösungen und Chemikalien

*Barth Medium:* 84 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.82 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.41 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O, 7.5 mM TRIS, Penicillin/Streptomycin, Cefuroxim; pH 7.4 mittels HCl

*Testlösung:* siehe Barth Medium, mit folgender Änderung: 54 mM NaCl, 30 mM KCl

*Pipettenlösung :* 120 mM KCl, 10 mM HEPES, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7.2 mittels KOH

$K_{Bad}$  : 120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, 1.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>;

pH 7.2 mittels KOH (*magnesiumfreie*  $K_{Bad} = K_{int}$ )

Für Experimente am Kir3.4\_S143T Kanal wurden 30 mM KCl durch 30 mM NaCl ersetzt (Vivaudou et al. 1997). Die pH-Wert Messung erfolgte mit einem pH-Meter (Modell: 766) der Firma Knick (Knick GmbH, Berlin, Deutschland).

Bezugsquellen der verwendeten Substanzen :

*Sigma-Aldrich:* PI(4,5)P<sub>2</sub> (Triammoniumsalz), ATP, Coenzym A, Oleoyl-Coenzym A, Alle anderen CoA-Ester, Poly-Lysin, Heparin, Neomycin, BSA, Phosphatidylcholin, Phosphatidylinositol; *Merck Bioscience:* PI(3,4)P<sub>2</sub> (Kaliumsalz) und PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Kaliumsalz); *Jena Bioscience:* dephospho Palmitoyl-CoA; *Aldrich:* Cu(II)-1,10-Phenantrolin. Von allen Substanzen wurden Stammlösungen in  $K_{int}$  angelegt. Diese

wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und erst am Tag ihrer Verwendung auf ihre endgültige Konzentration verdünnt. Vor der Verwendung der Lipide und CoA-Ester wurden diese mit einem Ultraschallbad der Firma Bandelin (Modell Sonorex RK 52) (Bandelin Electronics, Berlin, Deutschland) ca. 15 min. auf Eis sonifiziert und innerhalb von drei Stunden verwendet.

### **3.5. Datenaufnahme und Datenauswertung**

Zur Aufnahme und Auswertung der Daten wurde ein Apple Macintosh Power PC G3 (OS9.1) verwendet. Die Datenaufnahme erfolgte mit den Programmen Pulse++ und EPC9-screen (HEKA Electronics, Lambrecht, Deutschland). Die weitere Verarbeitung der Daten wurde mittels IGOR Pro Version (WaveMetrics, Lake Oswego (OR), USA) und Microsoft Excel 2000 (Microsoft, Redmond (WA), USA) durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mittels Canvas Version 3.5.4 (Deneba Systems, Victoria (BC), Canada) und die Textverarbeitung mittels Microsoft Word 2000 (Microsoft, Redmond (WA), USA). Der Berechnung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte und Hill Koeffizienten liegt die Hill Gleichung zugrunde:  $I/I_{\max} = (1/1+(X/\text{IC}_{50})^H)$ ;  $I_{\max}$  (Maximalamplitude des Stromes),  $X$  (Konzentration der Substanz),  $I$  (Strom resultierend aus der Applikation von  $X$ ),  $\text{IC}_{50}$  (Konzentration um 50 % des Ausgangsstromes zu blockieren),  $H$  (Hill-Koeffizient). Die angegebenen Werte entsprechen Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten. Die Fehlerwerte entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die Molekülstrukturen wurden mit Hilfe des kostenfreien Programms "ChemSketch" der Firma ACDlabs erstellt. ([www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com)). Die 3D-Kanalstrukturen wurden unter Anwendung der kommerziellen Software "Rastop" von P. Valadon bearbeitet. ([www.geneinfinity.org](http://www.geneinfinity.org))

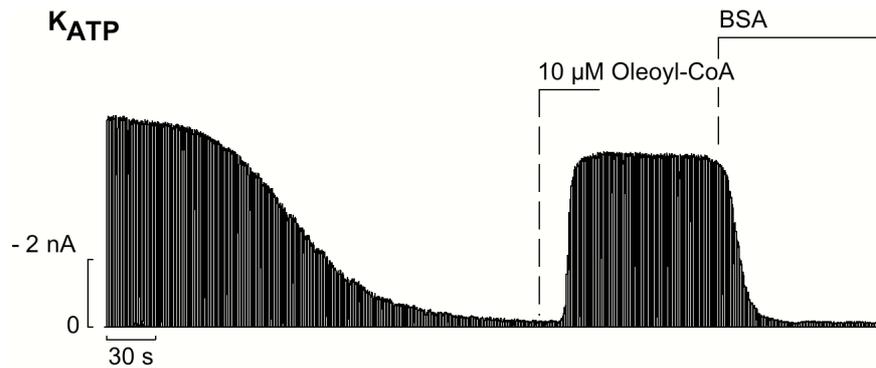
## 4. Ergebnisse

Der erste Teil dieses Kapitels beschreibt die komplexe Modulation von Kir-Kanälen durch LC-CoA. Gegenstand des zweiten Teils sind die strukturellen Veränderungen der Kir-Kanäle, die den verschiedenen Regulationsmechanismen (pH, Lipide) zu Grunde liegen.

Die im Folgenden dargestellten Messungen zeigen die invertierten Einwärtsströme bei -80mV, die durch ein repetitiv ablaufendes Pulsprotokoll erzeugt wurden. Das Pulsprotokoll war, sofern in der Abbildungslegende nicht anders angegeben, 20 mV (200 ms), -80 mV (1000 ms), 20 mV (200 ms). Als Haltepotential wurde -80 mV gewählt und die Aufnahmefrequenz betrug 0,1 kHz.

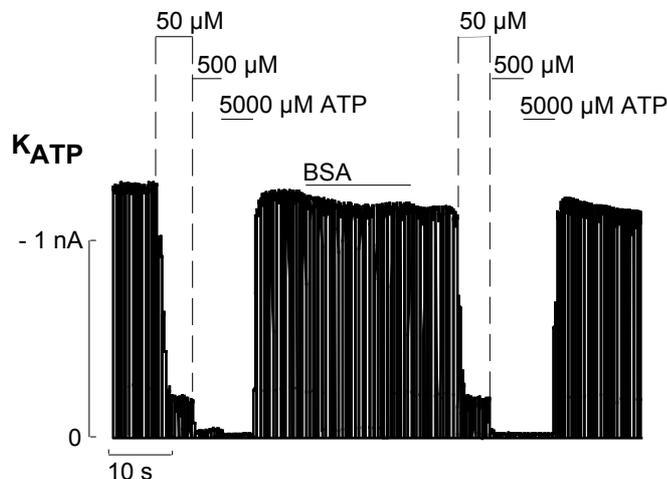
### 4.1. Modulation von $K_{ATP}$ -Kanälen durch Oleoyl-CoA und BSA

Die aktivierende Wirkung von Oleoyl-CoA auf  $K_{ATP}$ -Kanäle wurde erstmalig durch Larsson et al. 1996 beschrieben. Die folgenden Experimente wurden mit der Kir6.2-Untereinheit in Koexpression mit der SUR2A-Untereinheit durchgeführt (kardialer  $K_{ATP}$ -Kanal). Abbildung 4.1 zeigt den "run-down" des  $K_{ATP}$ -Kanals, dem vermutlich ein Abbau von  $PIP_2$  in der Membran zu Grunde liegt. Die anschließende Applikation von 10  $\mu$ M Oleoyl-CoA auf die intrazelluläre Seite eines Patches führt zu einer Reaktivierung der Kanäle. Die Wirkung von Oleoyl-CoA wird durch Applikation einer Rinder Serum Albumin-Lösung (BSA = Bovine Serum Albumine) vollständig aufgehoben.



**Abb. 4.1: Oleoyl-CoA Wirkung auf  $K_{ATP}$ -Kanäle.** Die horizontalen Balken repräsentieren die applizierten Substanzen und die Zeit der Verabreichung. Die Dauer und die Stromgröße des Experiments werden durch die Balken links und unterhalb der Stromkurve wiedergegeben. Oleoyl-CoA erhöht die Kanalaktivität des  $K_{ATP}$ -Kanals nach spontaner Inaktivierung (“run down“), jedoch die Verabreichung von BSA kann die Wirkung aufheben.

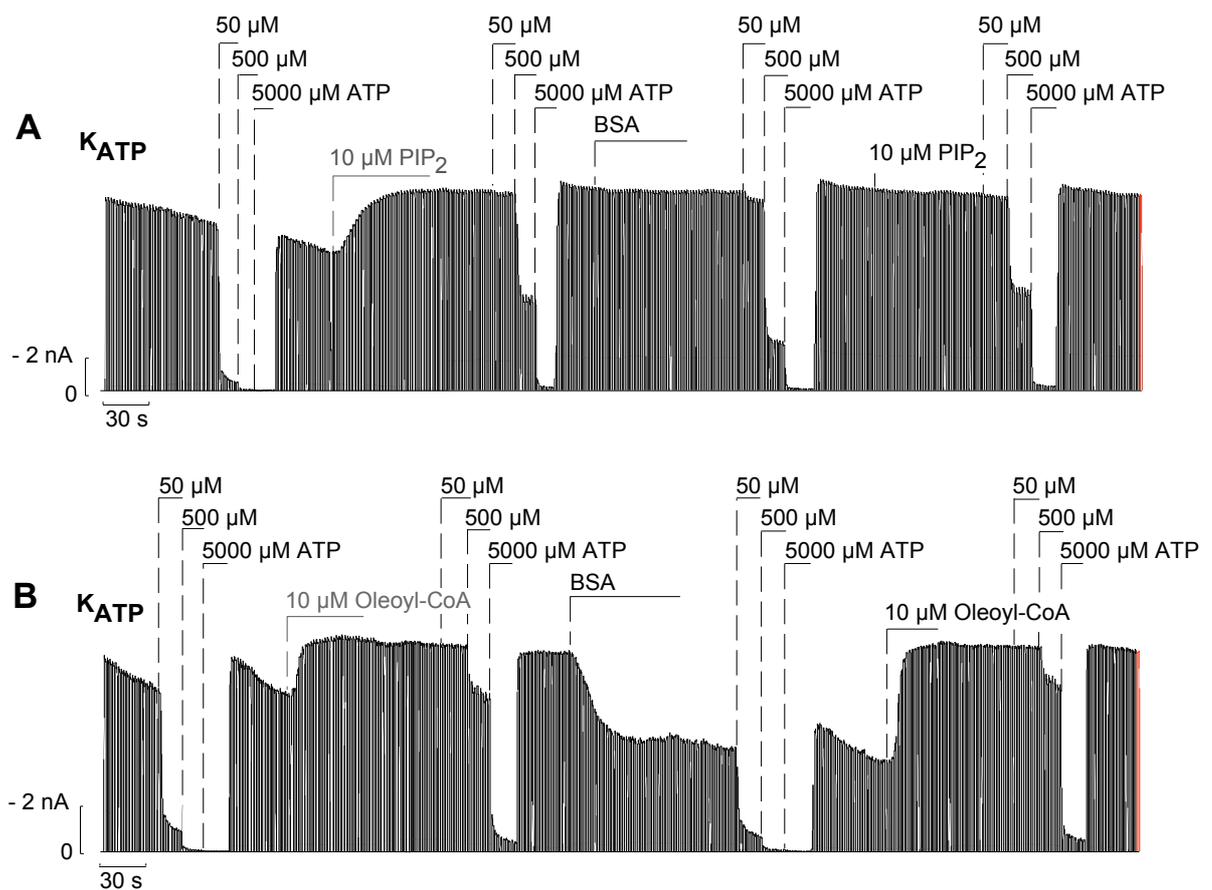
BSA bindet Fettsäuren und LC-CoA, daher ist wahrscheinlich, dass die BSA-Applikation zur Extraktion von LC-CoA aus der Membran führt. Abbildung 4.2 zeigt, dass BSA ohne vorherige Oleoyl-CoA-Applikation keine Wirkung auf  $K_{ATP}$ -Kanäle besitzt. Sowohl die Stromamplitude als auch die ATP-Empfindlichkeit werden durch BSA nicht verändert.



**Abb. 4.2: Applikation von ATP und BSA auf  $K_{ATP}$ -Kanäle.**

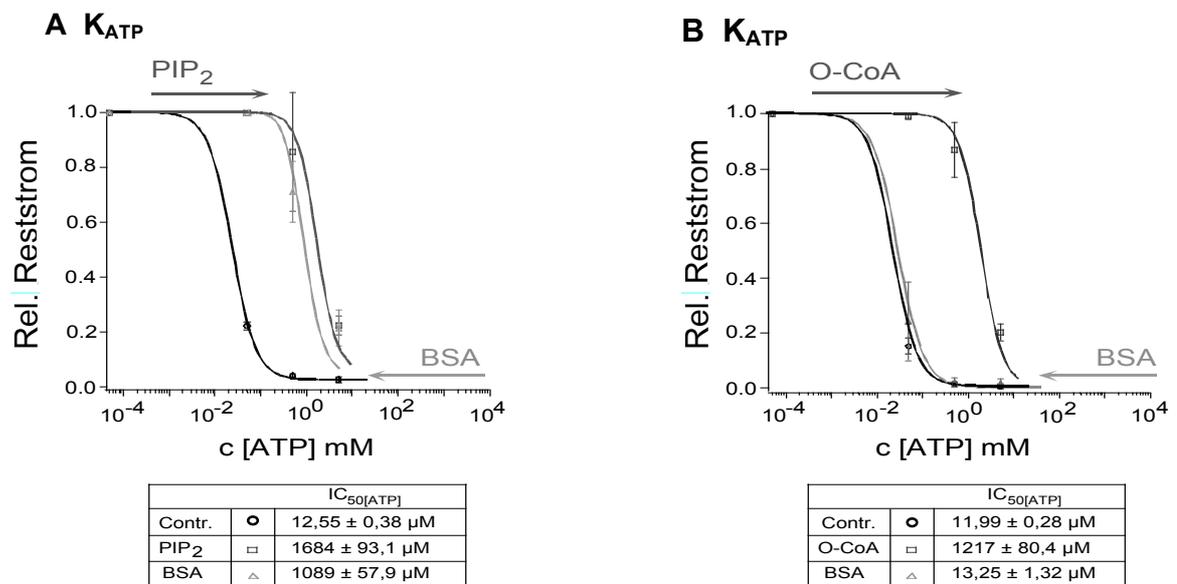
Des Weiteren wurde untersucht, ob BSA möglicherweise Auswirkungen auf die  $PIP_2$ -vermittelte Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen besitzt. Neben Oleoyl-CoA ist auch  $PIP_2$  in der Lage  $K_{ATP}$ -Kanäle zu stimulieren und die Empfindlichkeit gegenüber ATP zu erniedrigen (Baukrowitz et al. 1998). Diese Fähigkeiten sollten benutzt werden um ein

Maß für die Stimulationspotenz beider Lipide darzustellen. Dazu wurden verschiedene ATP-Konzentrationen (50  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 5000  $\mu\text{M}$ ) appliziert und abwechselnd Lipid und BSA verabreicht, um so den Unterschied in der Verschiebung der ATP-Empfindlichkeit zu bestimmen (Abbildung 4.3). Die Applikation von BSA bei Verwendung von  $\text{PIP}_2$  führte zu einer nur geringfügigen Zunahme der ATP-Empfindlichkeit (Abbildung 4.3 A). Hingegen zeigten Membranstücke, die mit Oleoyl-CoA behandelt wurden, eine dramatische Zunahme der ATP-Empfindlichkeit durch BSA, wobei ebenso die Stromamplitude verringert wurde (Abbildung 4.3 B). Eine erneute Lipid-Applikation reduziert die ATP-Empfindlichkeit im gleichen Maße wie zu Versuchsbeginn.



**Abb. 4.3: Bestimmung der ATP-Empfindlichkeit des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals.** Applikation von ATP, BSA und  $\text{PIP}_2$  (A) beziehungsweise Oleoyl-CoA (B) auf  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle.

Die Experimente wurden mehrmals durchgeführt und es wurden daraus Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt, um den  $IC_{50}$ -Wert (Konzentration zur 50 % Inhibition des Ausgangsstromes) der ATP-Inhibition zu bestimmen (Abbildung 4.4). Initial wurde ein  $IC_{50 [ATP]}$  von  $12,6 \mu\text{M}$  beziehungsweise  $12 \mu\text{M}$  gemessen. Nach ca. 90 sec. Applikation von  $PIP_2$  betrug der  $IC_{50 [ATP]}$   $1684 \mu\text{M}$  beziehungsweise  $1217 \mu\text{M}$  nach der ca. 60 sec. Oleoyl-CoA Inkubation. Das anschließende Anspülen von BSA führte im Falle von Oleoyl-CoA zu einer Rückverschiebung des  $IC_{50 [ATP]}$  auf  $13,3 \mu\text{M}$ . Hingegen bei der Verwendung von  $PIP_2$  wurde die ATP-Empfindlichkeit nur geringfügig durch BSA erhöht ( $IC_{50 [ATP]} = 1090 \mu\text{M}$ ) (Abbildung 4.4).



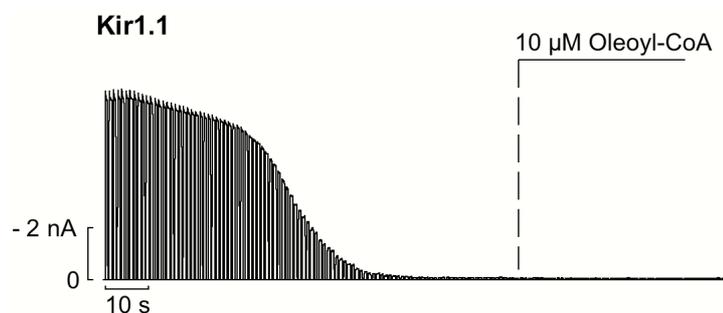
**Abb. 4.4: Affinitätsunterschied von BSA gegenüber verschiedenen Lipiden.** Graphische Darstellung des relativen Reststrom und der ATP Konzentration zeigt die ATP-Empfindlichkeit von  $K_{ATP}$ -Kanälen nach abwechselnder Verabreichung von BSA und  $PIP_2$  (A) beziehungsweise Oleoyl-CoA (B). Die  $IC_{50[ATP]}$ -Werte, die zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs erzielt wurden, sind in den Tabellen dargestellt (Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = min. 3)).

Damit kann festgestellt werden, dass BSA die Wirkung von Oleoyl-CoA auf  $K_{ATP}$ -Kanäle rückgängig macht. Hingegen scheint sich die  $PIP_2$ -Konzentration in der Membran, durch die Applikation von BSA, nicht wesentlich zu ändern. Die Ergebnisse

implizieren, dass BSA spezifisch LC-CoA aus der Membran extrahiert. Dies eröffnet eine mögliche Verwendung von BSA als Hilfsmittel im Umgang mit nativen Zellen (Myozyten oder pankreatische Zellen), beispielsweise könnte in Untersuchungen der ATP-Empfindlichkeit von  $K_{ATP}$ -Kanälen zwischen der Wirkung von LC-CoA und  $PIP_2$  unterschieden werden.

## 4.2. LC-CoA Regulation von Kir-Kanälen

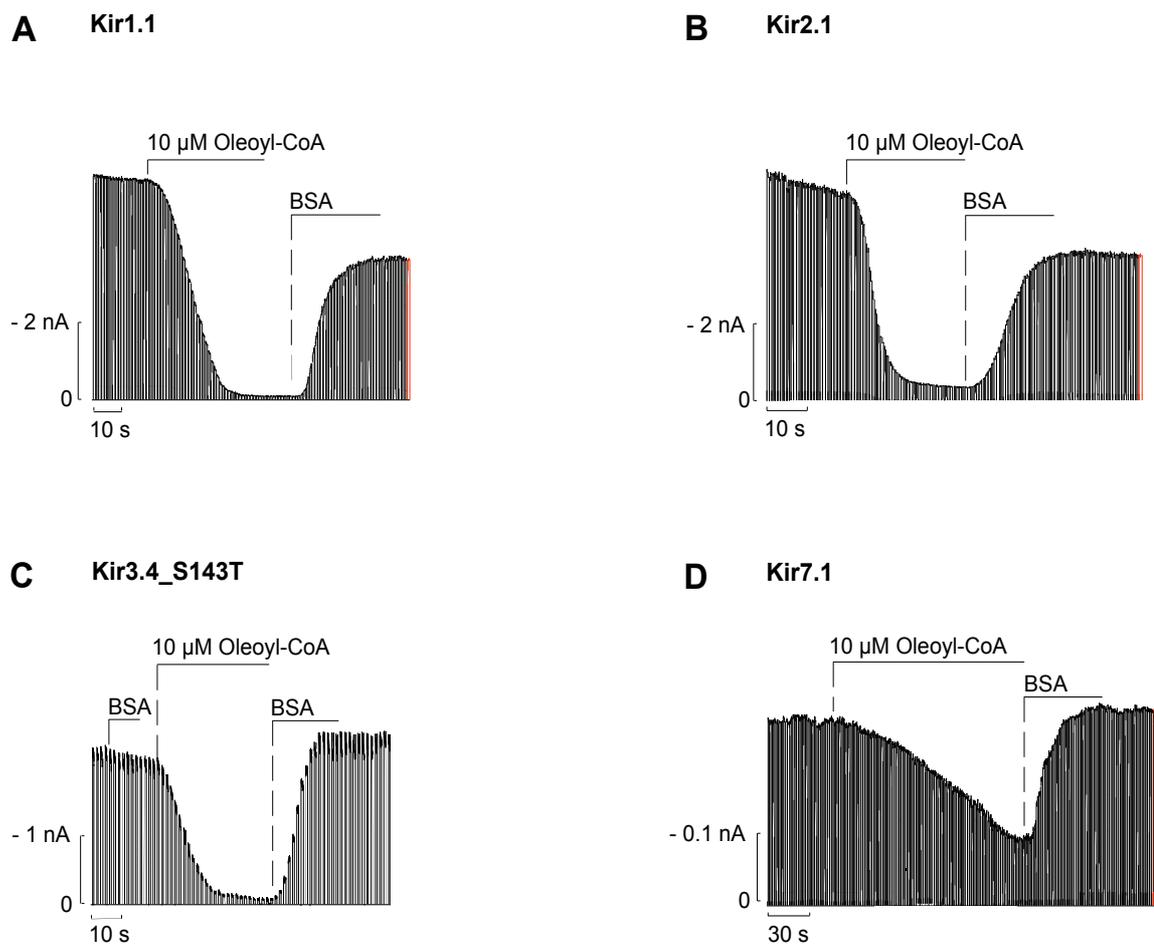
In der Literatur wird beschrieben, dass die Wirkung von LC-CoA auf  $K_{ATP}$ -Kanäle beschränkt ist (Gribble et al. 1998, Liu et al. 2001). In der Tat, führt die Applikation von 10  $\mu$ M Oleoyl-CoA zu keiner Reaktivierung von z. B. Kir1.1-Kanälen (Abbildung 4.5), wie bereits berichtet wurde (Rohacs et al. 2003).



**Abb. 4.5: Oleoyl-CoA Wirkung auf Kir-Kanäle.** Die Applikation von Oleoyl-CoA auf inaktivierte Kir1.1-Kanäle führt zu keiner Erhöhung der Kanalaktivität.

Bislang galt jedoch als ungeklärt, ob LC-CoA eine Wirkung auf aktive Kir-Kanäle besitzt. Um dies zu untersuchen, wurden Patche in eine Lösung exidiert, der Natriumpyrophosphat in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt war. Diese Substanz ist ein unspezifischer Phosphatase-Inhibitor und reduziert den spontanen Verlust von Kanalaktivität in exzidierten Patchen ("run-down") (Hilgemann und Ball 1996).

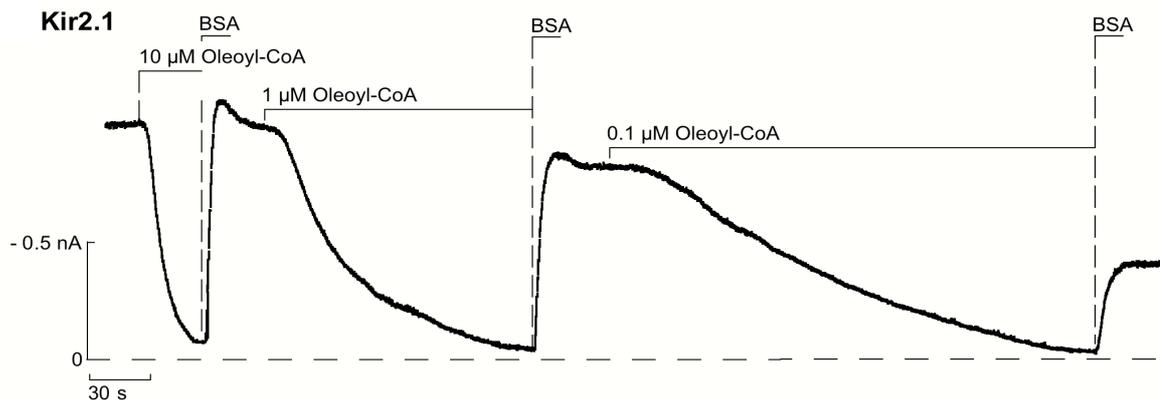
Abbildung 4.6 A zeigt, dass die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Oleoyl-CoA zu einer schnellen Inhibition von Kir1.1-Kanälen führt und erst die nachfolgende BSA Applikation diese Inhibition wieder aufhebt. Auch das Anspülen von 10  $\mu\text{M}$  Oleoyl-CoA auf Kir2.1, Kir3.4\_S143T und Kir7.1 führte zu einer schnellen Inhibition der Kanäle (Abbildung 4.6 B-D). Somit scheint Oleoyl-CoA auch für die Regulation anderer Kir-Kanäle von Bedeutung zu sein.



**Abb. 4.6: Oleoyl-CoA als potenter Inhibitor von Kir Kanälen.** A-D) Regulation durch 10  $\mu\text{M}$  Oleoyl-CoA und die Reversibilität durch BSA für mehrere Kir-Kanäle.

Abbildung 4.7 zeigt die Wirkung und den Zeitverlauf der Applikation von verschiedenen Oleoyl-CoA-Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ ) auf Kir2.1-Kanäle. Dabei führten höhere Konzentrationen an Oleoyl-CoA zu einer schnelleren Inhibition. Die durch 10  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  Oleoyl-CoA erzeugte Inhibition konnte durch BSA vollkommen

rückgängig gemacht werden. Hingegen konnte bei Verwendung von 0,1  $\mu\text{M}$  Oleoyl-CoA zwar eine deutliche Inhibition erzeugt werden, jedoch wurde nur noch ein Teil der Ausgangsstromamplitude durch BSA zurückgebracht (Abbildung 4.7). Dies kann wahrscheinlich auf den “run-down“ des Kanals zurückgeführt werden, welcher aus der langen Applikationsdauer resultiert.

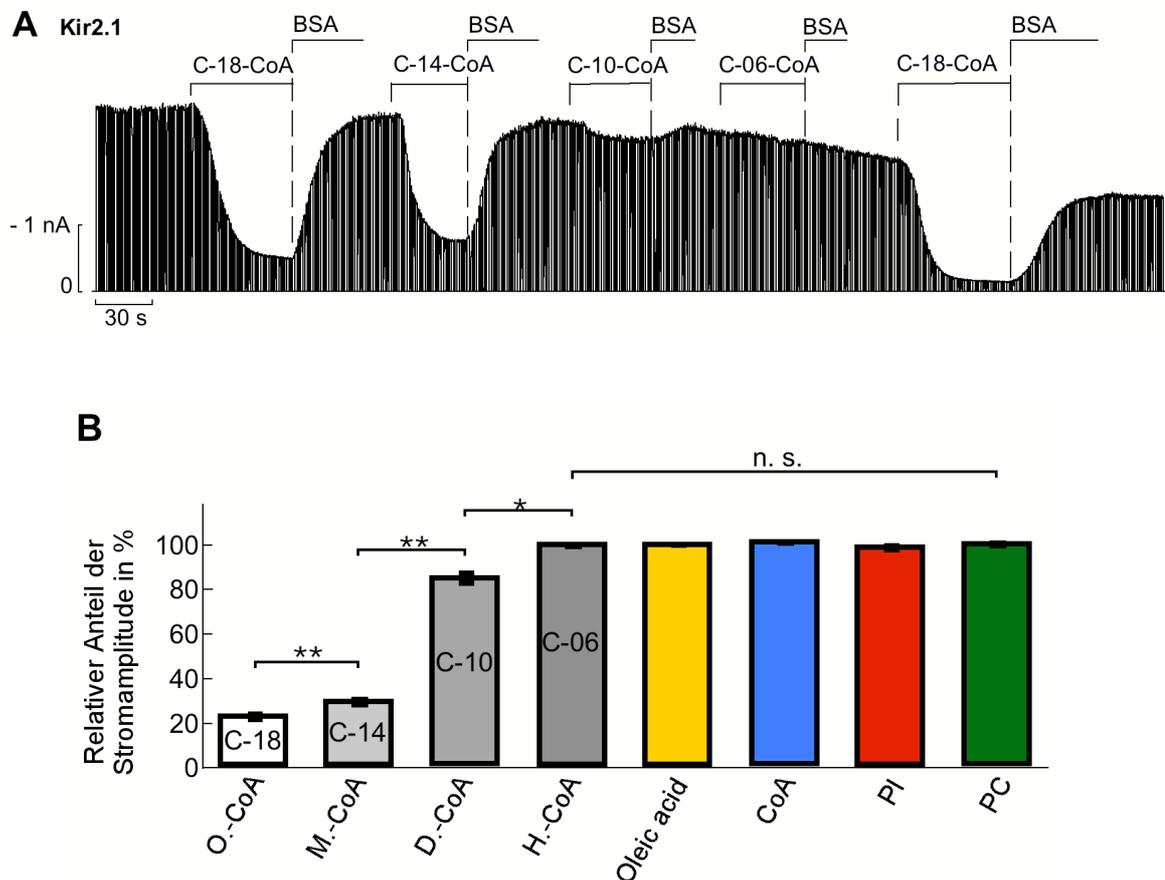


**Abb. 4.7: Konzentrationsabhängigkeit der Oleoyl-CoA Inhibition.** Die Inhibition von Kir2.1-Kanälen ist konzentrationsabhängig, mit unterschiedlichem Inhibitions-Zeitverlauf. Die waagerechte, gestrichelte Linie deutet die Strom-Nulllinie an. Diese Messung erfolgte bei einer kontinuierlichen Spannung von  $-100$  mV, hier sind die Einwärtsströme nicht invertiert dargestellt.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition kann möglicherweise auf eine Akkumulation von Oleoyl-CoA in der Membran zurückgeführt werden. Bei niedrigen Konzentrationen wird die Membrankonzentration, welche zur Inhibition von Kir-Kanälen führt, langsamer erreicht als bei höherer Konzentration von Oleoyl-CoA in der Applikationslösung.

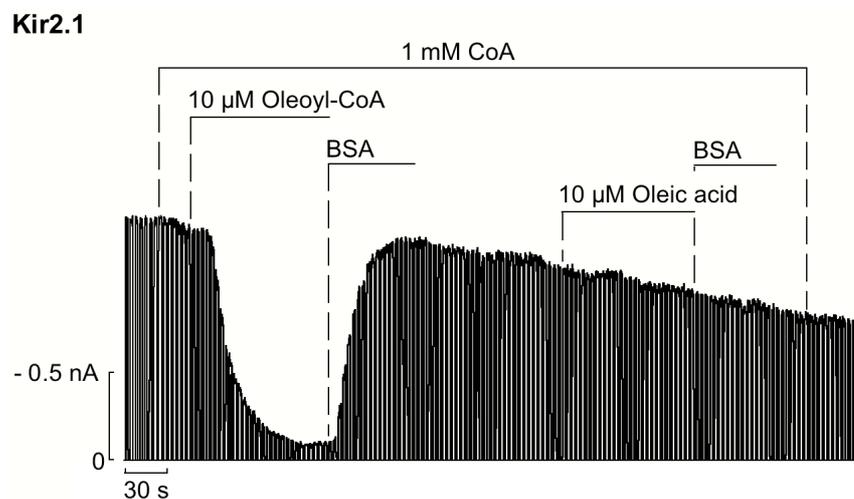
#### 4.2.1. Molekulare Determinanten der LC-CoA Inhibition

Um die Bedeutung der Fettsäure für die LC-CoA Inhibition zu untersuchen, wurden Ester mit variierender Fettsäurekettenlänge verwendet. Auf das frisch exzidierte Patch mit Kir2.1-Kanälen wurde Oleoyl-CoA (C18), Myristoyl-CoA (C14), Decanoyl-CoA (C10) und Hexanoyl-CoA (C06) appliziert, und anschließend mit BSA aus dem Patch entfernt (Abbildung 4.8 A). Die Inhibition nahm in Richtung C18 > C14 > C10 > C 6 ab.



**Abb. 4.8: Inhibitionspotenz von Oleoyl-CoA korreliert mit der Kettenlänge der Fettsäureseitenkette.** **A)** Inhibition von Kir2.1-Kanälen durch CoA-Ester mit unterschiedlicher Fettsäure Kettenlänge (je 10  $\mu$ M) und anschließender BSA Applikation. **B)** Inhibitionsübersicht aus Versuchen analog zu A, dargestellt ist der relative Anteil der Stromamplitude nach der Verabreichung des entsprechenden Lipids. Die verschiedenen CoA-Ester zeigen für die Kettenlänge spezifische Inhibitionswerte an (t-test; \*\* [p < 0,01], bzw. \* [p < 0,05]), die Werte für die anderen Substanzen sind statistisch nicht signifikant verschieden (t-test; n. s. [p > 0,05]) (n = min. 4).

Es wurden ebenfalls andere Substanzen zum Vergleich getestet, so ergab sich für die Membranlipide Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin beziehungsweise für Ölsäure (Oleic acid) und CoA (alle 50  $\mu\text{M}$ ), keine Inhibition des Kir2.1-Kanals (Abbildung 4.8 B). Somit scheint die Struktur des CoA–Fettsäure Esters notwendig für die Inhibition zu sein, da beide Einzelsubstanzen (Oleoyl-CoA = Ölsäure + CoA) keine Inhibitionspezialität besitzen. Diese Annahme wurde in einem weiteren Experiment bestätigt, da auch die Präsenz beider Einzelsubstanzen zeitgleich am Kanal nicht zur Inhibition führte (Abbildung 4.9).

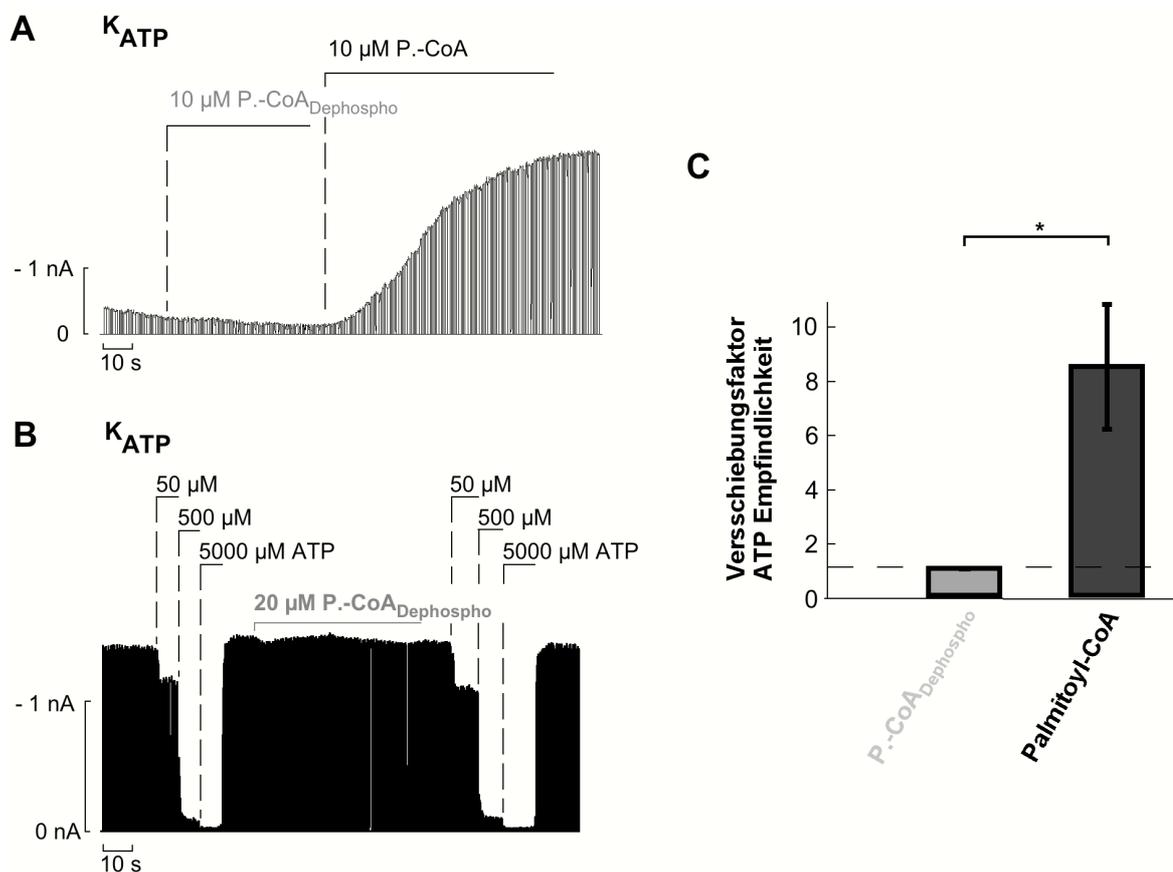


**Abb. 4.9: Inhibition von Kir2.1 Kanälen in Anwesenheit vom 1 mM CoA.** Auch die zeitgleiche Präsenz von CoA und Ölsäure führen zu keiner Inhibition.

Die verstärkte Inhibition durch LC-CoA mit einer verlängerten Fettsäureseitenkette resultiert wahrscheinlich aus der erhöhten Hydrophobizität des Moleküls und der damit verbundenen verstärkten Akkumulation der Ester in der Membran.

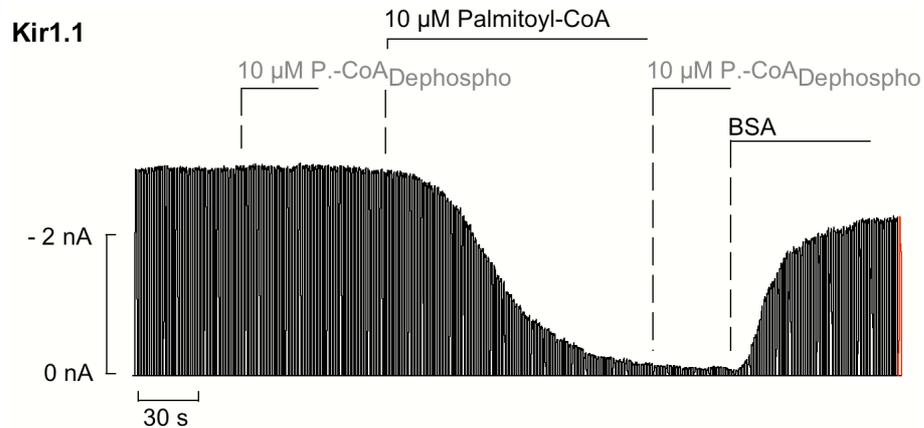
Neben der Fettsäureseitenkette wurde auch der hydrophile Molekülteil der LC-CoA auf eine Bedeutung für die Regulation von Kir-Kanälen untersucht. Die CoA-Kopfgruppe besitzt drei Phosphatgruppen, eine befindet sich an dem Ribosering an Position drei, und zwei weitere verbinden als Pyrophosphat die Ribose mit der Panthotensäureeinheit (Abbildung 1.7). Ob die 3'-Ribosephosphatgruppe von Bedeutung

für die Wirkung von LC-CoA ist, wurde mit den anschließenden Experimenten untersucht. Dazu wurde ein Ester verwendet in dem die 3'-Ribosephosphatgruppe entfernt wurde und im Folgenden als "Palmitoyl-CoA<sub>Dephospho</sub>" bezeichnet wird. Palmitoyl-CoA zeigt am K<sub>ATP</sub>-Kanal eine ähnliche Wirkung wie Oleoyl-CoA. Die Applikation auf komplett inaktivierte K<sub>ATP</sub>-Kanäle führt zu einer Aktivierung, ebenso vermag Palmitoyl-CoA die ATP-Empfindlichkeit von K<sub>ATP</sub>-Kanälen zu reduzieren (Abbildung 4.10 A, C). Im Gegensatz dazu, konnte Palmitoyl-CoA<sub>Dephospho</sub> weder K<sub>ATP</sub>-Kanäle aktivieren noch deren ATP-Empfindlichkeit verändern (Abbildung 4.10 A-C).



**Abb. 4.10: Bedeutung der Phosphat-Kopfgruppe für die Aktivierung durch Palmitoyl-CoA am K<sub>ATP</sub>-Kanal.** **A)** Inkubation von K<sub>ATP</sub>-Kanälen durch dephospho - und Palmitoyl-CoA. **B)** Die ATP-Empfindlichkeit kann durch Palmitoyl-CoA<sub>Dephospho</sub> nicht erniedrigt werden. **C)** Lipid induzierte Verschiebung der ATP-Empfindlichkeit von K<sub>ATP</sub>-Kanälen aus Versuchen wie in (B) zeigt für Palmitoyl-CoA einen Faktor von  $8,6 \pm 2,3$  (dunkler Balken) und für Palmitoyl-CoA<sub>Dephospho</sub> ein Faktor von  $1,1 \pm 0,2$  (heller Balken). Werte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM (t-test; \* [p < 0,05], n = 5).

Des Weiteren zeigte das Anspülen von Palmitoyl-CoA<sub>Dephospho</sub> auf Membranstücke mit Kir1.1-Kanälen, dass die 3'-Ribosephosphatgruppe auch für die Inhibition von entscheidender Bedeutung ist (Abbildung 4.11).



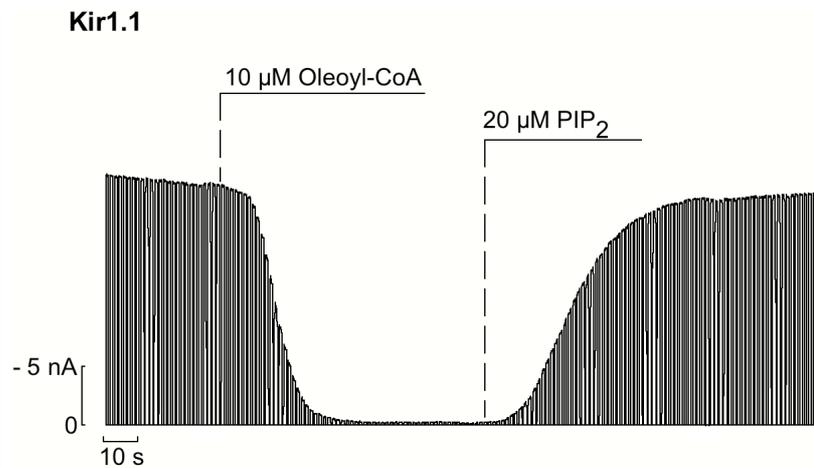
**Abb. 4.11: Inhibition von Palmitoyl-CoA am Kir1.1-Kanal.** Eine Inhibition erfolgt nur, wenn die Position drei des Riboseringes phosphoryliert ist, jedoch mit dem dephosphorylierten Palmitoyl-CoA erfolgt keine Inhibition.

Diese Resultate implizieren, dass eine Kanal-Interaktion von LC-CoA an die Anwesenheit der 3'-Ribosephosphatgruppe gebunden ist und somit als eine Voraussetzung für die Inhibition (z. B. Kir1.1) beziehungsweise für die Aktivierung ( $K_{ATP}$ ) von Kir-Kanälen angesehen werden kann.

#### 4.2.2. Mechanismus der LC-CoA Wirkung

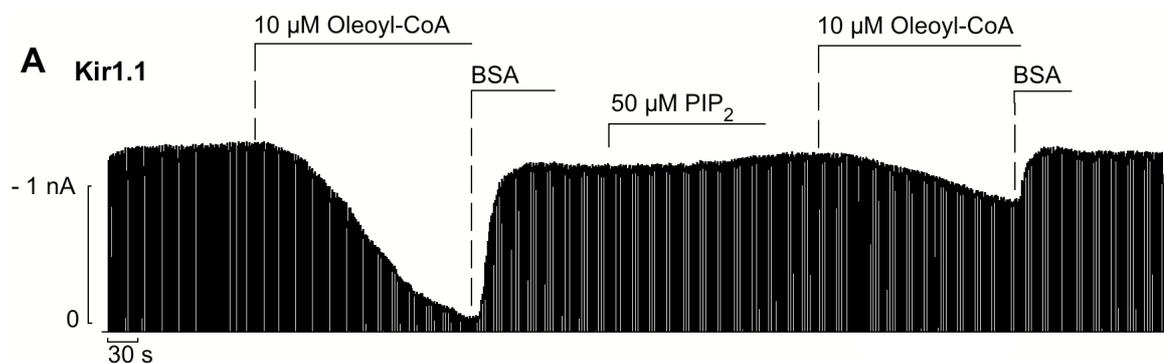
Unsere Untersuchungen ergaben, dass  $K_{ATP}$ -Kanäle für PIP<sub>2</sub> und Oleoyl-CoA wahrscheinlich eine gemeinsame Bindungsstelle besitzen (Schulze et al. 2003b). Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob auch für andere Kir-Kanäle eine gemeinsame Bindungsstelle existiert, was für eine Kompetition beider Lipide sprechen würde. Um dies zu testen, wurde auf ein Patch mit Kir1.1-Kanälen eine Lösung mit 10 μM Oleoyl-CoA angespült, wodurch eine schnelle Inhibition der Kanäle erfolgte.

Anschließend wurden 20  $\mu\text{M}$   $\text{PIP}_2$  appliziert, was zu einer vollständigen Reaktivierung der Kanäle führte (Abbildung 4.12).

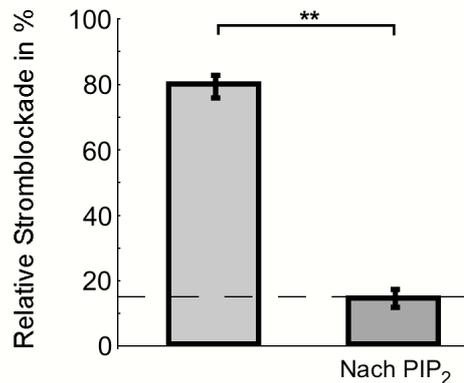


**Abb. 4.12: Antagonismus zwischen Oleoyl-CoA und  $\text{PIP}_2$ .** Die Inhibition durch Oleoyl-CoA am Kir1.1-Kanal wird durch  $\text{PIP}_2$  aufgehoben.

Dieses Ergebnis impliziert, dass die Inhibition von Kir-Kanälen durch LC-CoA auf eine Verdrängung des Aktivators  $\text{PIP}_2$  zurückzuführen ist. Diese Hypothese sollte nun weiter untersucht werden. Abermals wurden Kir1.1-Kanäle durch Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Oleoyl-CoA inhibiert und durch BSA reaktiviert. Jetzt wurden 50  $\mu\text{M}$   $\text{PIP}_2$  appliziert um eine hohe Membrankonzentration an  $\text{PIP}_2$  zu erzielen und eine etwaige kompetitive Verdrängung durch LC-CoA zu erschweren. In der Tat zeigte das erneute Anspülen von 10  $\mu\text{M}$  Oleoyl-CoA eine deutlich verminderte Inhibition der Kir1.1-Kanäle (Abbildung 4.13 A, siehe unten).



**B**



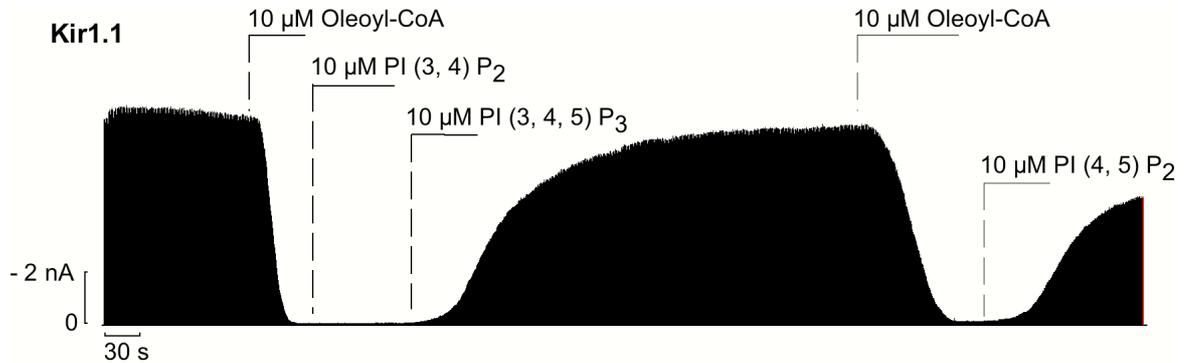
**Abb. 4.13: Applikation von Oleoyl-CoA und PIP<sub>2</sub> auf Kir1.1-Kanäle. A)** Die Inhibition durch Oleoyl-CoA wird durch PIP<sub>2</sub> abgeschwächt. **B)** Auswertung aus Versuchen wie in A zeigt die um  $65 \pm 3 \%$  abgeschwächte Inhibitionsanzahl von Oleoyl-CoA vor ( $78,64 \pm 3,6\%$ ) und nach PIP<sub>2</sub> Applikation ( $13,8 \pm 2,64\%$ ). Werte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM (t-test; \*\* [p < 0,01], n = 5).

Die mehrfache Durchführung dieser Experimente bewies, dass die Präapplikation von PIP<sub>2</sub> die Inhibitionsanzahl von Oleoyl-CoA für Kir1.1-Kanäle um ca. 65 % vermindert (Abbildung 4.13 B). Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass LC-CoA in einer Konkurrenz den Aktivator PIP<sub>2</sub> von einer gemeinsamen Lipid-Bindungsstelle verdrängt. Dabei kann LC-CoA selbst keine Aktivierung hervorrufen, was die beobachtete Inhibition erklären würde.

### 4.3. Phosphoinositid-Spezifität der Regulation von Kir-Kanälen

Wie bereits erwähnt, reflektiert die Phosphoinositid-Spezifität möglicherweise eine unterschiedliche Bindungsaffinität der verschiedenen Kir-Kanäle gegenüber Phosphoinositiden (siehe Seite 19) (Rohacs et al. 2003). Es sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob die Phosphoinositid-Spezifität auch für die Konkurrenz mit LC-CoA von Bedeutung ist. Zu diesem Zwecke wurde nach Exzision des Patches mit

Kir1.1-Kanälen, durch 10  $\mu\text{M}$  Oleoyl-CoA eine Kanal-Inaktivierung erzeugt, und dann versucht diese Wirkung durch Anspülen von  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  und  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  beziehungsweise  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  umzukehren (Abbildung 4.14).

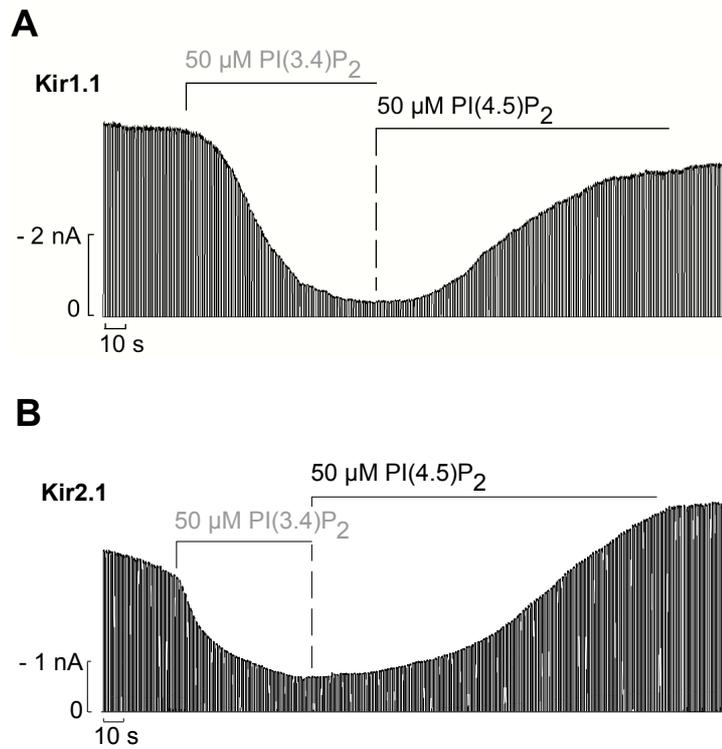


**Abb. 4.14: Zusammenhang zwischen Phosphoinositid-Spezifität und Oleoyl-CoA Inhibition am Kir1.1-Kanal.** Die Applikation von Oleoyl-CoA,  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ ,  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  und  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ .

$\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  und  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  zeigen eine ähnliche Reaktivierungspotenz für Kir1.1-Kanäle, wohingegen die Applikation von  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  keine Reaktivierung erzeugen konnte (Abbildung 4.14). In der Veröffentlichung von Rohacs et al. wird berichtet, dass Kir1.1-Kanäle nach kompletter Inaktivierung ("run-down") durch  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  und  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  aktiviert werden, jedoch durch  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  nicht stimuliert werden (Rohacs et al. 2003). Demzufolge scheint die Oleoyl-CoA Inhibition eine Art "run-down"-Phänomen in Kir-Kanälen auszulösen. Dies impliziert, dass Oleoyl-CoA in der Lage ist  $\text{PIP}_2$  vom Kanal zu verdrängen.

Die Untersuchungen von Rohacs et al. konnten jedoch nicht zeigen, ob die fehlende Aktivierung von Kir1.1-Kanälen auf eine fehlende Bindung von  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  zurückgeführt werden kann. Alternativ könnte  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  in ähnlicher Weise wie Oleoyl-CoA wirken und trotz einer Bindung am Kanal keine Aktivierung hervorrufen. Dies sollte mit den folgenden Experimenten untersucht werden. Abbildung 4.15 A zeigt, dass die Applikation von 50  $\mu\text{M}$

PI(3,4)P<sub>2</sub> zu einer Inhibition von Kir1.1-Kanälen führt, die durch das nachfolgende Anspülen von PI(4,5)P<sub>2</sub> wieder aufgehoben werden kann.



**Abb. 4.15: Die Inhibition von Kir1.1-Kanälen (A) und Kir2.1-Kanälen (B) durch PI(3,4)P<sub>2</sub> kann durch Applikation von PI(4,5)P<sub>2</sub> rückgängig gemacht werden.**

Auch die Inkubation von Kir2.1-Kanälen mit 50 μM PI(3,4)P<sub>2</sub> führt zu einer Kanal-Inaktivierung (Abbildung 4.15 B). Damit kann festgestellt werden, dass PI(3,4)P<sub>2</sub> so wie LC-CoA im Stande ist eine Inhibition an Kir-Kanälen zu erzeugen. Die Potenz der Inhibition ist allerdings vermindert, da der Zeitverlauf der Inhibition durch 50 μM PI(3,4)P<sub>2</sub> deutlich langsamer als durch 10 μM Oleoyl-CoA ausfällt.

Schlussfolgernd kann man sagen, dass Kir-Kanäle eine gemeinsame Bindungsstelle für alle Lipide (LC-CoA, PI(4,5)P<sub>2</sub> usw.) besitzen. Die Anwesenheit von PI(4,5)P<sub>2</sub> und/oder PI(3,4,5)P<sub>3</sub> führt zu einer Aktivierung von Kir-Kanälen, deren kompetitive Verdrängung durch LC-CoA und/oder PI(3,4)P<sub>2</sub> resultiert im Verschluss der Kanäle (ausgenommen K<sub>ATP</sub>-Kanäle).

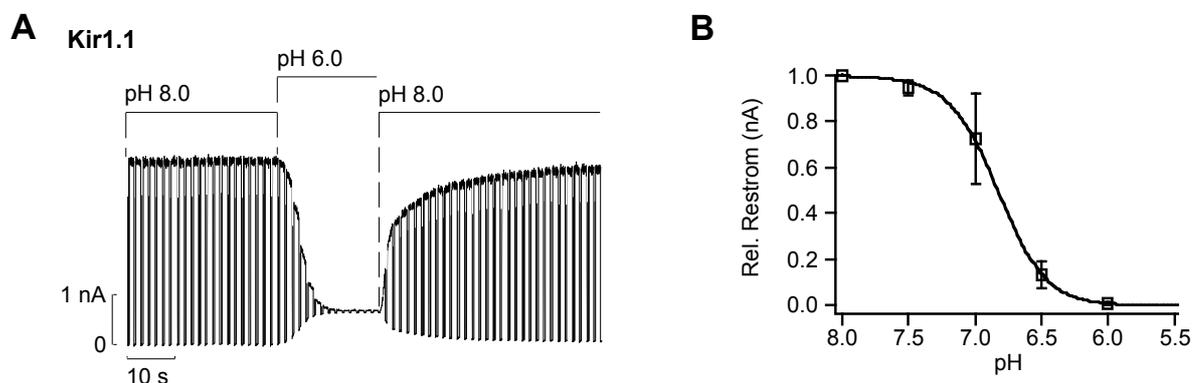
## 4.4. Molekulare Mechanismen der Schaltvorgänge am Kir1.1-Kanal

Die nachstehenden Kapitel fokussieren sich auf die Klärung der Frage nach den strukturellen Veränderungen in Kir-Kanälen, die der Wirkung der verschiedenen Regulationsmechanismen (pH, LC-CoA, PIP<sub>2</sub>) zu Grunde liegen.

### 4.4.1. pH-Gating von Kir1.1-Kanälen

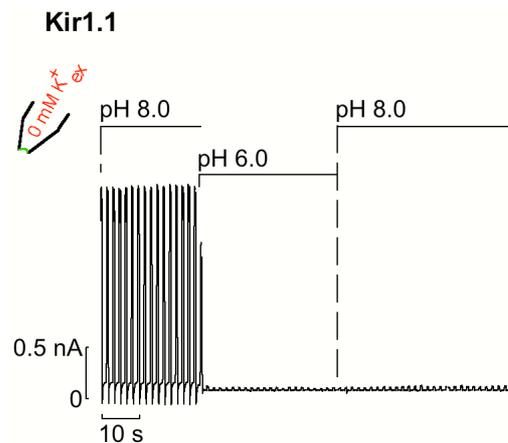
Im Folgenden soll anhand des pH-Gatings von Kir1.1-Kanälen exemplarisch aufgezeigt werden, wie elektrophysiologische Untersuchungen Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen der Schaltvorgänge von Ionenkanälen erlauben. Diese einleitenden Experimente basieren auf publizierten Arbeiten von Dr. Uwe Schulte (Schulte et al. 1998, 1999, 2001).

Abbildung 4.16 zeigt, dass eine intrazelluläre Azidifizierung von Kir1.1-Kanälen zum schnellen Schließen der Kanäle führt, während die Alkalisierung in einer Reaktivierung resultiert (Abbildung 4.16 A).



**Abb. 4.16: Die Inhibition von Kir1.1-Kanälen durch intrazelluläre Azidifizierung. A)** Applikation von pH 8.0 und pH 6.0 auf Kir1.1-Kanäle. **B)** Dose-Response Kurve zeigt das Verhältnis zwischen relativem Restrom und intrazellulärem pH, ermittelt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 7).

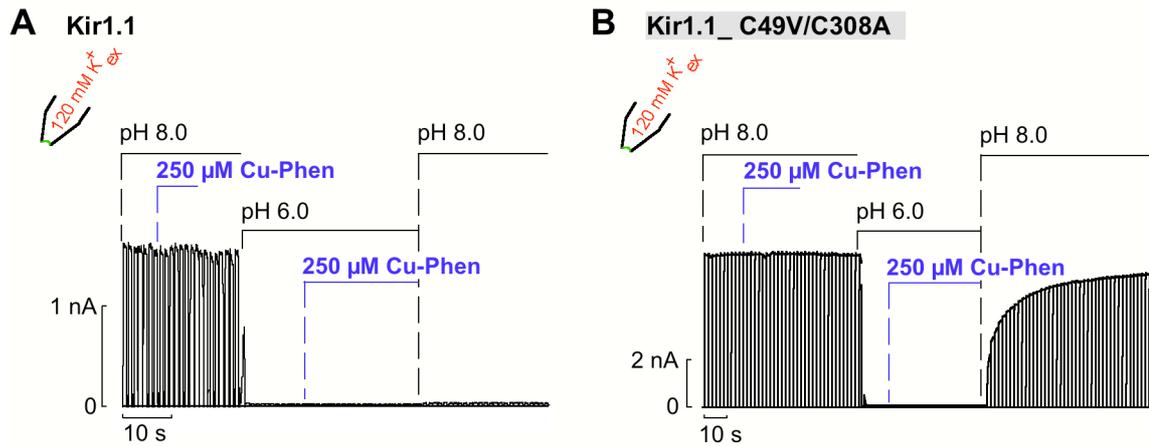
Das Anspülen von Lösungen mit abfallenden pH-Werten führte in Übereinstimmung mit der Literatur zu einem  $pH_{0,5} = 6,84 \pm 0,23$  und es wurde ein Hill-Koeffizient von  $3,1 \pm 0,31$  ermittelt (Schulze et al. 2003a) (Abbildung 4.16 B). Wie bereits in Kapitel 1.4 aufgeführt (siehe Seite 24), wird die pH-Regulation von Kir1.1-Kanälen durch Protonierung eines Lysin (K80) eingeleitet, und von strukturellen Änderungen des N- und C-Terminus begleitet (Schulte et al. 1998, Schulte et al. 1999). Neben dem intrazellulären pH-Wert wird die Aktivität von Kir1.1-Kanälen auch durch die Konzentration an extrazellulärem Kalium geregelt. Um diesen Sachverhalt darzustellen, wurde Kalium aus der Pipettenlösung entfernt und durch das impermeable Ion NMDG<sup>+</sup> (N-Methyl-(d)-glucose) ersetzt. In Abbildung 4.17 wird ersichtlich, dass die intrazelluläre Azidifizierung in Abwesenheit von extrazellulärem Kalium ein nicht reversibler Prozess ist.



**Abb. 4.17: Einfluss der extrazellulären Kaliumkonzentration auf das pH-Gating von Kir1.1-Kanälen.**

Schulte et al. schlussfolgerten, dass die pH-inhibierte Kanalkonformation eine weitere Konformationsänderung durchläuft, die zu einer irreversiblen Inhibition führt. Das Binden von K<sup>+</sup> an eine extrazelluläre Kaliumbindungsstelle verhindert eine solche irreversible Konformationsänderung. Dies impliziert, dass auch Abschnitte der

Porenregion in die Vorgänge des pH-Gatings involviert sind und erklärt warum es in Abwesenheit von extrazellulärem Kalium zu einem irreversiblen Verlust der Kanalaktivität kommt (Schulte et al. 2001). Die Bewegung intrazellulärer Kanal-Domänen während der pH-Inhibition konnte durch eine zustandsabhängige chemische Modifikation (DTNB) zweier intrazellulär lokalisierter Cysteine (C49 im N-Terminus und C308 im C-Terminus) in Kir1.1-Kanälen dargestellt werden. Diese beiden Cysteine wurden durch DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)) nur im pH-inhibierten Zustand modifiziert, nicht aber im geöffneten Zustand (Schulte et al. 1998). Für eine Inkubation durch das oxidierende Agens Cu(II)-1,10-Phenanthrolin (Cu-Phen) wurde eine ähnliche Zustandsabhängigkeit beobachtet. In der Tat, das Anspülen von 250  $\mu$ M Cu-Phen auf Kir1.1-Kanäle führte bei alkalischen pH-Werten zu keiner Modifikation. Hingegen die Applikation des Oxidationsmittels auf geschlossene Kanäle erzeugte einen irreversiblen Verschluss des Kanals und lässt sich wahrscheinlich durch eine Modifikation im pH-inhibierten Zustand erklären (Abbildung 4.18 A). Andererseits konnte die Hypothese von Schulte et al. auch dadurch experimentell bestätigt werden, dass die Mutation beider Cysteine nicht nur zu DTNB-unempfindlichen Kanälen führte (Schulte et al. 1998), sondern auch in einem Verlust der Redoxeigenschaften resultierte. Die doppelmutierten Kir1.1\_C49V/C308A-Kanäle zeigen eine unveränderte pH-Empfindlichkeit, hingegen konnte die Applikation von Cu-Phen keine Modifikation der geschlossenen Kanäle erzeugen (Abbildung 4.18 B). Somit scheinen beide Cysteine in Proteinbereichen lokalisiert zu sein, die während des pH-Gatings strukturelle Veränderungen erfahren.



**Abb. 4.18: Redoxempfindlichkeit des pH-Gatings von Kir1.1-Kanälen** **(A)** Das pH-Gating von Kir1.1-Kanälen kann durch die Applikation von Cu-Phen unterbunden werden, hingegen **(B)** die Kanalmutation Kir1.1\_C49V/C308A führt zum Verlust der Redoxempfindlichkeit.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Kir1.1-Kanäle über einen allosterischen Schaltmechanismus verfügen. Das Binden eines intrazellulären Faktors (Protonen) wird in eine Proteinbewegung umgesetzt, die gleichermaßen extrazelluläre Proteinabschnitte ( $K^+$ -Bindungsstelle) involviert. Auch die existierenden Kristallstrukturen von GIRK und KirBac1.1 geben Grund zur Vermutung, dass die Transmembransegmente TM1 und TM2 Rotationsbewegungen beim Übergang vom geöffneten zum geschlossenen Zustand durchlaufen, die sich im N- und C-Terminus fortsetzen (Bichet et al. 2003).

Daraus abgeleitet stellt sich die übergeordnete Frage, inwieweit die verschiedenen Regulationsfaktoren (ATP, pH, Lipide) eine universelle (evolutionär konservierte) Schaltmaschinerie nutzen, welche an dasselbe Gate in der Kanalpore gekoppelt ist, oder ob unterscheidbare Schaltmechanismen existieren.

Die anschließenden Kapitel befassen sich mit der Frage, ob die Konformationsänderungen während des pH-Gatings auch durch die Vorgänge des Lipid-Gatings (LC-CoA,  $PIP_2$ ) ausgelöst werden können und möglicherweise von einem universellen Gating-Mechanismus in Kir1.1-Kanälen ausgegangen werden kann.

#### 4.4.2. PIP-Gating von Kir1.1- und Kir2.1-Kanälen

Die Lipidbindungsstelle in Kir6.X-Kanälen wird von zytoplasmatischen Bereichen des N- und C-Terminus gebildet (Schulze et al. 2003b). Unklar ist, wie die Bindung von PIP<sub>2</sub> oder LC-CoA zur Aktivierung der Kanäle führt. Um diese zentrale Frage der Lipidregulation zu untersuchen, wurde ein experimentelles Protokoll entwickelt, welches das PIP-Gating gut sichtbar macht. Fan und Makielski konnten bereits zeigen, dass Polykationen, wie z. B. Poly-Lysin, die Wirkung von PIP<sub>2</sub> auf K<sub>ATP</sub>-Kanäle neutralisiert (Fan und Makielski 1997). Der Mechanismus der Poly-Lysin Wirkung ist das Resultat einer elektrostatischen Wechselwirkung, auf Grund seiner positiven Ladung besitzt Poly-Lysin eine hohe Affinität für PIP<sub>2</sub> und führt durch Komplexierung von PIP<sub>2</sub> zu einer Abnahme der Konzentration von wirksamen PIP<sub>2</sub> in der Membran. Die Applikation des Polyanions Heparin entfernt Poly-Lysin vom Patch und bewirkt eine Aktivierung durch die erneute Freisetzung des PIP<sub>2</sub>. Mit diesem als "PIP-Gating" bezeichnete Vorgang kann auf direkte Weise PIP<sub>2</sub> vom Kir-Kanal entfernt und wieder zugefügt werden. Tatsächlich führt die Applikation von 250 µg/ml Poly-Lysin zur Inaktivierung von Kir1.1- beziehungsweise Kir2.1-Kanälen, welche durch Anspülen von 500 µg/ml Heparin wieder umgekehrt werden kann (Abbildung 4.19).

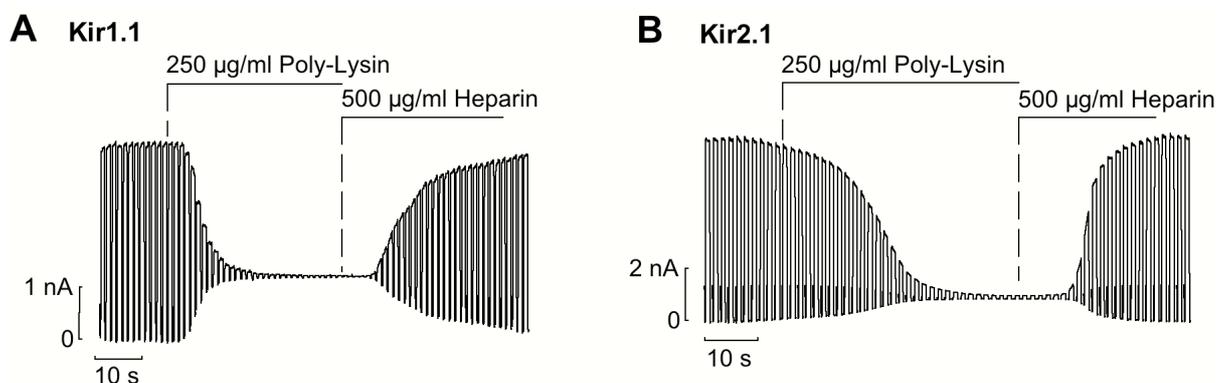


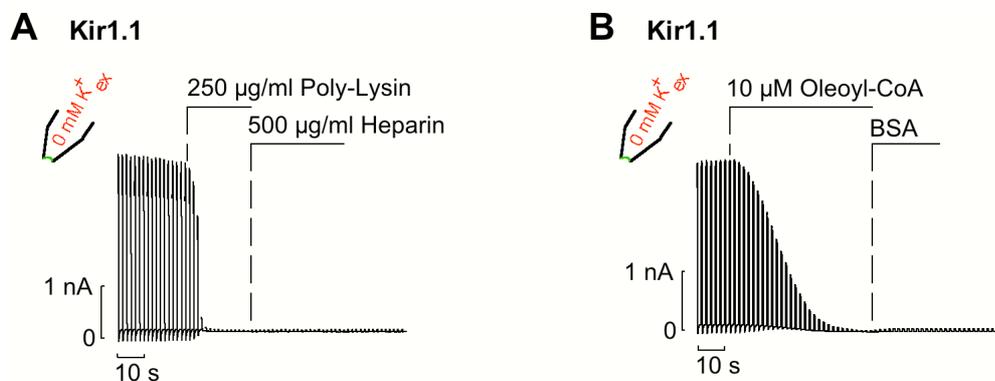
Abb. 4.19: PIP-Gating von (A) Kir1.1- beziehungsweise (B) Kir2.1-Kanäle durch die Applikation von Poly-Lysin und Heparin.

Das PIP-Gating reflektiert die Wirkung von PIP<sub>2</sub> auf Kir-Kanäle und wird im Folgenden dazu benutzt, die Gating-Mechanismen der Lipid-Regulation von Kir1.1-Kanälen darzustellen.

#### 4.4.3. Lipid-Gating von Kir1.1-Kanälen

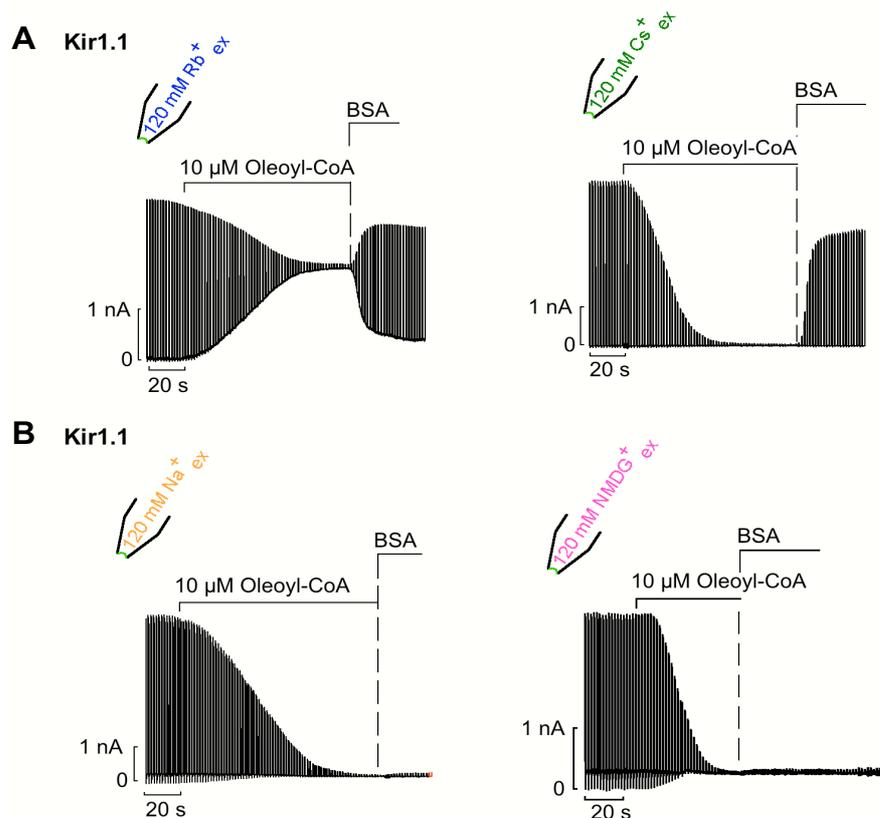
Die Aktivität von Kir-Kanälen wird neben einer Vielzahl intrazellulärer Moleküle im ganz besonderen Maße durch Lipide reguliert. Zusammen mit den obigen Vorergebnissen sollten nun Experimente mit dem Ziel durchgeführt werden, die strukturellen Grundlagen für das Lipid-Gating (PIP<sub>2</sub>, LC-CoA) zu untersuchen.

Wie bereits erwähnt, ist die Kalium-Inaktivierung von Kir1.1-Kanälen an den intrazellulären pH-Wert gekoppelt (siehe Seite 24) (Schulte et al. 2001). Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob Veränderungen der extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration die Vorgänge des Lipid-Gatings beeinflussen. Aus Abbildung 4.20 A geht hervor, dass die Poly-Lysin Applikation auf frisch exzidierte Patche mit Kir1.1-Kanälen in Abwesenheit von extrazellulärem Kalium zu einem irreversiblen Verlust der Kanalaktivität führt.



**Abb. 4.20: PIP- und LC-CoA-Gating von Kir1.1-Kanälen in Abwesenheit von extrazellulärem Kalium.**

In gleicher Weise wurde LC-CoA angespült, auch die Applikation von Oleoyl-CoA führte zu einem irreversiblen Verlust der Kanalaktivität (Abbildung 4.20 B). Die Anwesenheit von extrazellulärem Kalium scheint sowohl für das PIP- als auch für das LC-CoA-Gating in Kir1.1-Kanälen von entscheidender Bedeutung zu sein. Möglicherweise ist nicht nur die pH-Inhibition sondern auch das Lipid-Gating an die Regulation durch extrazelluläres Kalium gekoppelt. Um diesen Sachverhalt weiter aufzuklären, sollte nun ermittelt werden, ob das Lipid-Gating durch die Spezies des extrazellulären Ions beeinflusst wird. Abbildung 4.21 A zeigt, dass die Applikation von Oleoyl-CoA mit Rubidium ( $Rb^+$ ) und Cäsium ( $Cs^+$ ) als extrazelluläre Ionen, dem LC-CoA-Gating in Gegenwart von  $K^+$  entspricht (Abbildung 4.6 A). Hingegen die impermeablen Ionen  $Na^+$  und  $NMDG^+$  konnten dabei  $K^+$  nicht ersetzen (Abbildung 4.21 B).

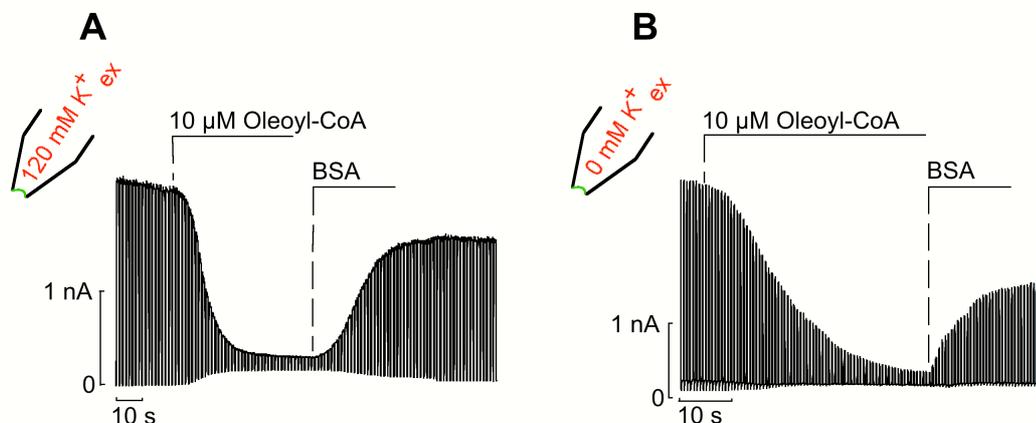


**Abb. 4.21: LC-CoA-Gating von Kir1.1-Kanälen in Gegenwart verschiedener extrazellulärer Ionen.**

Somit scheinen Ionen, die durch die Pore gelangen, einen irreversiblen Verlust der Kanalaktivität zu verhindern. Das Lipid-Gating könnte, ähnlich dem pH-Gating (Schulte et al. 2001), einem allosterischen Mechanismus unterliegen und zu Konformationsänderungen führen die extrazelluläre Proteinabschnitte (K<sup>+</sup>-Bindungsstelle) involviert.

Doi et al. konnten zeigen, das ein Austausch des Porenabschnittes in Kir1.1-Kanälen durch die homologe Sequenz des K<sup>+</sup>-unabhängigen Kir2.1-Kanals zum Verlust der Kalium-Inaktivierung führt. Diese chimären Kanäle zeigen ein unverändertes pH-Gating, welches allerdings nicht an die Gegenwart von extrazellulärem Kalium gebunden ist (Doi et al. 1996). Somit kann die Kalium-Inaktivierung als eine strukturelle Besonderheit von Kir1.1-Kanälen angesehen werden. Mit den nachfolgenden Experimenten sollte aufgeklärt werden, ob die Lipid-induzierte Kalium-Inaktivierung gleichermaßen auf Kir1.1-Kanäle beschränkt ist. Das Anspülen von 10 µM Oleoyl-CoA auf frisch exzidierte Membranstücke resultiert in einer schnellen und reversiblen Inaktivierung von Kir2.1-Kanälen (Abbildung 4.22 A). Im Gegensatz zu Kir1.1-Kanälen, scheint das LC-CoA-Gating durch die Abwesenheit von extrazellulärem Kalium nur in geringem Maß beeinflusst zu werden (Abbildung 4.22 B).

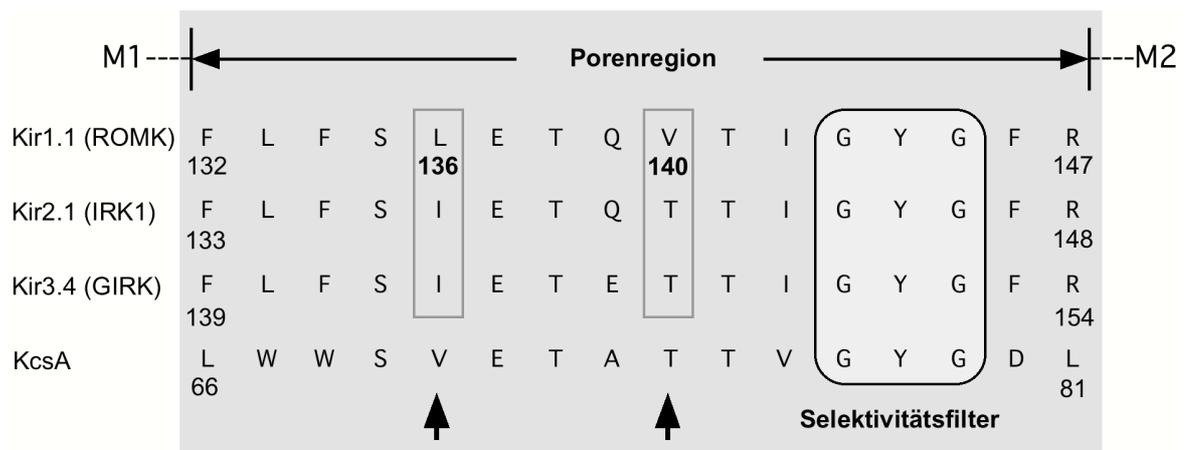
#### Kir2.1



**Abb. 4.22: Inkubation von Kir2.1-Kanälen mit Oleoyl-CoA beziehungsweise BSA in (A) An- und (B) Abwesenheit von extrazellulärem Kalium.**

Dieses Resultat gibt Grund zu der Annahme, dass die LC-CoA Inhibition von Kir2.1-Kanälen - im Gegensatz zu Kir1.1-Kanälen - nicht von einer Konformationsänderung begleitet wird, welche in Abwesenheit von extrazellulärem Kalium zu einem irreversiblen Verlust der Kanalaktivität führt.

Ein Vergleich der Sequenzabfolge im Bereich des Selektivitätsfilters zeigt nur geringe Unterschiede (Abbildung 4.23).

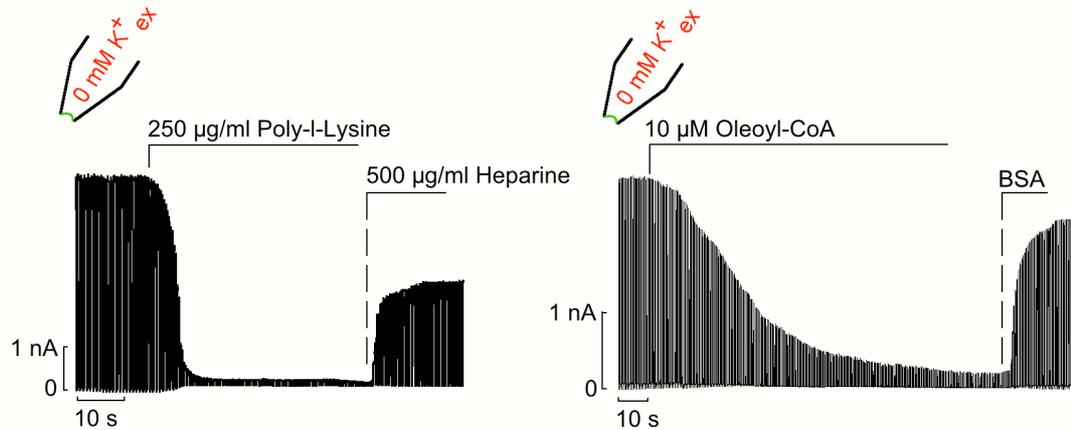


**Abb. 4.23: Aminosäuresequenz der Porenregion für mehrere Kalium Kanäle (Schulte et al. 2001).**

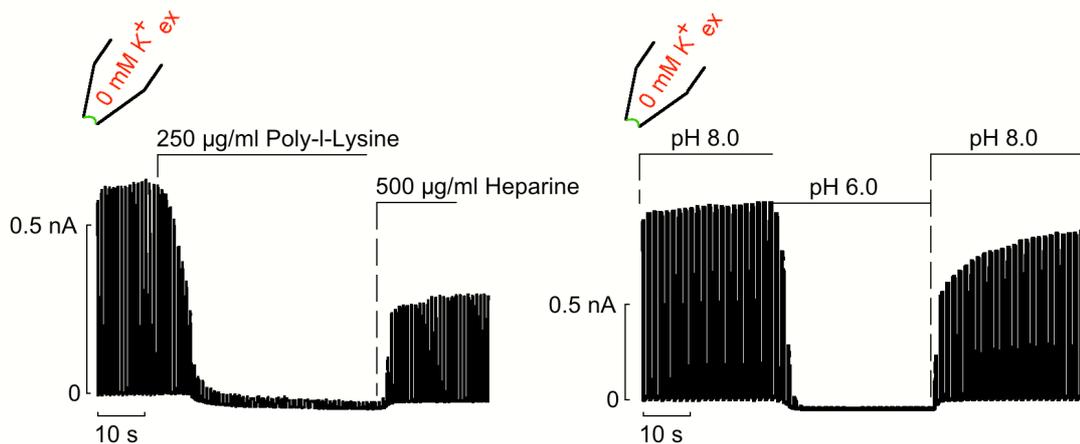
Kir1.1-Kanäle besitzen an Position 136 ein Leucin und an 140 ein Valin, die homologen Stellen in Kir2.1-Kanälen sind mit einem Isoleucin und einem Threonin besetzt (Abbildung 4.23). Da die Porenregion in Kir-Kanälen im Allgemeinen hoch konserviert ist, könnte die abweichende Aminosäuresequenz von Bedeutung für die Unterschiede zwischen Kir1.1- und Kir2.1-Kanälen sein. Um diese Frage zu untersuchen wurden die Aminosäuren an Position 136 und 140 des Kir1.1-Kanals durch die homologen Reste des Kir2.1-Kanals ersetzt. In den anschließenden Experimenten wurden Kir1.1\_L136I- und Kir1.1\_V140T-Kanäle in Abwesenheit von extrazellulärem Kalium durch Applikation von Oleoyl-CoA und Poly-Lysin inhibiert. Abbildung 4.24 zeigt, dass die Kanalaktivität

nicht nur durch BSA (Oleoyl-CoA Inhibition) sondern auch durch Heparin (Poly-Lysin) wieder zurückgewonnen werden kann.

### A Kir1.1\_V140T



### B Kir1.1\_L136I

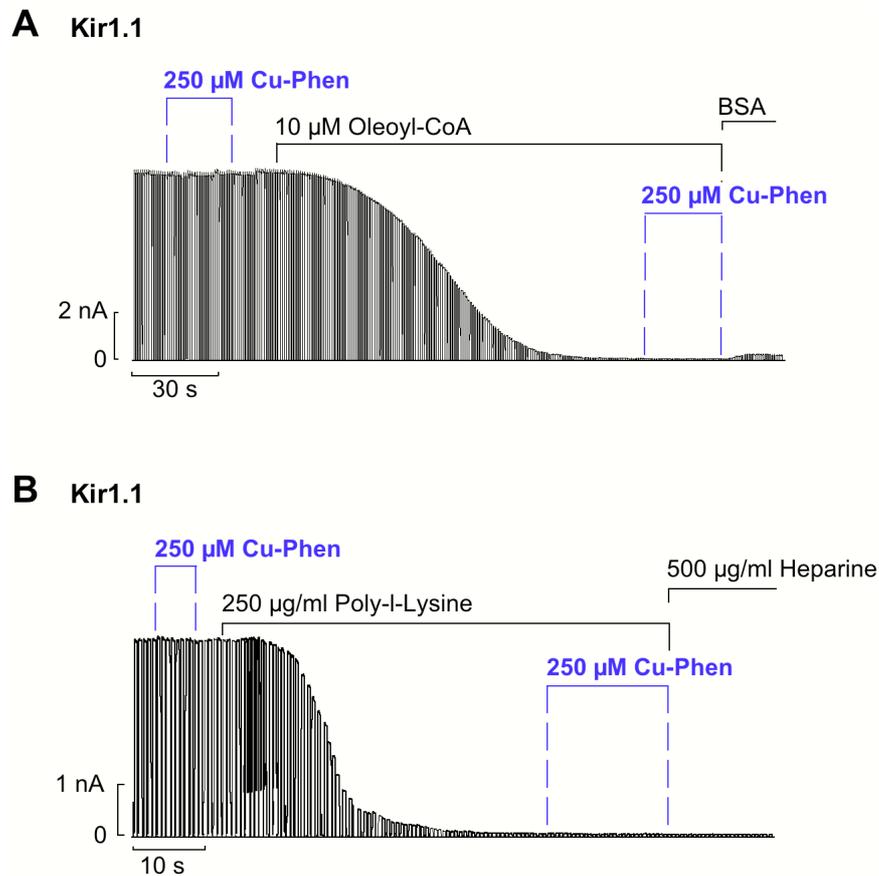


**Abb. 4.24: Mutationen T140 und I136 im Porenabschnitt kompensieren die Abhängigkeit gegenüber extrazellulärem Kalium in Kir1.1 Kanälen.**

Diese Resultate zeigen, dass der Selektivitätsfilter in Kir1.1-Kanälen sowohl an der K<sup>+</sup>-Abhängigkeit des pH- als auch des Lipid-Gatings beteiligt ist.

Um strukturelle Veränderungen in intrazellulären Domänen der Kanalpore während des Lipid-Gatings sichtbar zu machen, wurde die Technik der Cystein Modifikation angewendet. Kir1.1-Kanäle werden im pH-inhibierten Zustand durch Oxidation zweier intrazellulärer Cysteine (C49 und C308) modifiziert, womit eine Reaktivierung der

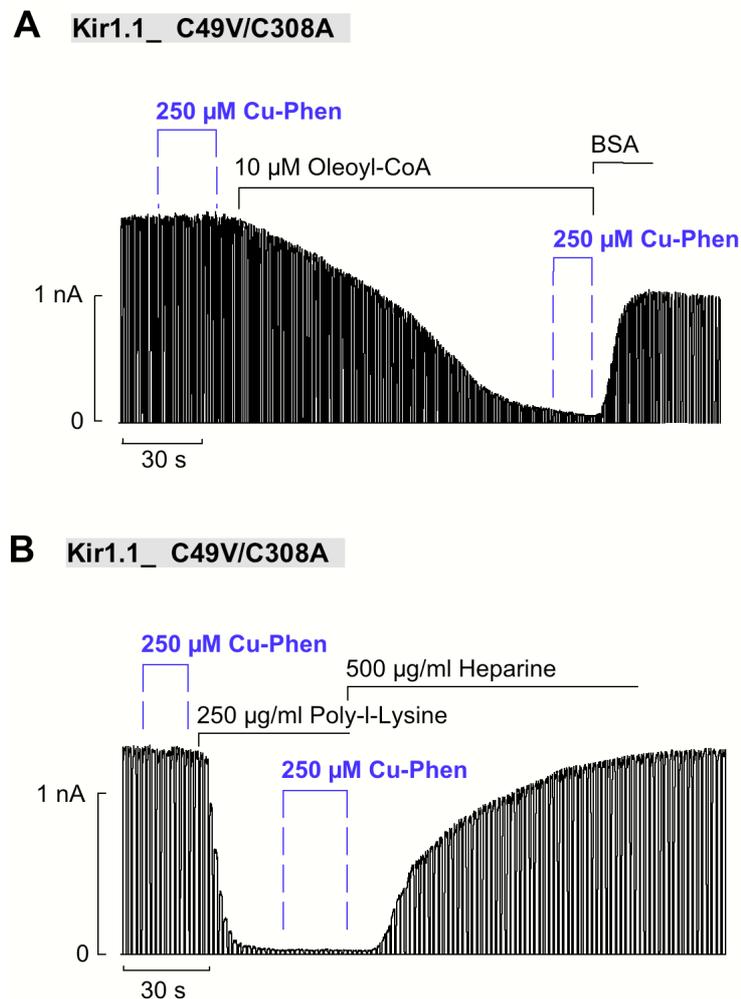
Kanäle verhindert wird (Abbildung 4.18). Abbildung 4.25 A zeigt das Anspülen des Oxidationsmittels Cu-Phen auf zuvor inaktivierte Kir1.1-Kanäle.



**Abb. 4.25: Einfluss der Cu-Phen Applikation auf das Lipid-Gating von Kir1.1-Kanälen.**

In beiden Fällen des Lipid-Gatings wurde das exzidierte Patch durch 250 μM Cu-Phen im geöffneten Zustand nicht modifiziert, hingegen verhinderte die Applikation im PIP<sub>2</sub>-depletierten (geschlossenen) Zustand eine anschließende Reaktivierung durch BSA oder Heparin. Es ist zu vermuten, dass ähnlich dem pH-Gating, auch das Lipid-Gating Konformationsänderungen intrazellulärer Domänen erzeugt. Außerdem konnte die konkrete Beteiligung der Cysteine 49 im N- und 308 im C-Terminus durch Untersuchungen mit dem doppelmutierten Kir1.1\_C49V/C308A-Kanal nachgewiesen werden. Die Applikation von Cu-Phen auf frisch exzidierte Membranstücke führte weder

im geschlossenen noch im geöffneten Zustand zu einer Modifizierung von Kir1.1\_C49V/C308A-Kanälen (Abbildung 4.26).



**Abb. 4.26: Applikation von Cu-Phen, Oleoyl-CoA, BSA beziehungsweise Poly-Lysin und Heparin auf Kir1.1\_C49V/C308A-Kanäle.**

Somit scheint auch das Lipid-Gating von strukturellen Veränderungen begleitet zu sein, die mit Bewegungen der Cysteine 49 im N- und 308 im C-Terminus einhergehen.

Wir postulieren, dass unterschiedliche Liganden (pH, PIP<sub>2</sub>, LC-CoA) einen konservierten Gating-Mechanismus benutzen, um ähnliche Konformationsänderungen der Kir1.1-Kanalproteine zu induzieren und so das Öffnen (PIP<sub>2</sub>) und Schließen (Protonen, LC-CoA) des Kanals bewirken.

## 5. Diskussion

### 5.1. Molekulare Determinanten der LC-CoA Regulation

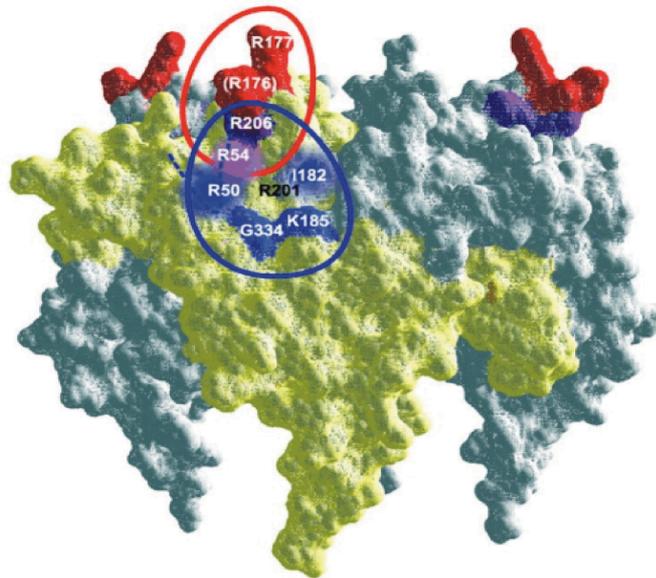
Phosphoinositide, insbesondere  $\text{PIP}_2$ , sind Bestandteile des Plasmalemma und erhöhen die Offenwahrscheinlichkeit von Kir-Kanälen. Die Wirkung von  $\text{PIP}_2$  resultiert aus einer Interaktion mit einer Lipidbindungsstelle, die durch basische Aminosäuren im N- und C-Terminus der Kanäle gebildet wird (Schulze et al. 2003a, Cukras et al. 2002). Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass auch Ester langkettiger Fettsäuren mit Coenzym A (LC-CoA) eine Aktivierung von  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanälen hervorrufen. Des Weiteren wurde beschrieben, dass LC-CoA, ähnlich wie  $\text{PIP}_2$ , seine Wirkung durch Binden an die Kir6.2-Untereinheit des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals vermittelt (Larsson et al. 1996, Gribble et al. 1998, Rohacs et al. 2003). Dieser Sachverhalt wurde unter anderem auch durch unsere Arbeitsgruppe detailliert untersucht. Im Einklang mit anderen Laboratorien postulieren wir, dass  $\text{PIP}_2$  und Oleoyl-CoA mit der gleichen Lipidbindungsstelle des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals interagieren (Schulze et al. 2003b, Rohacs et al. 2003, Enkvetchakul und Nichols 2003, Manning Fox et al. 2004). Beide Substanzen weisen ähnliche Strukturmerkmale auf, so besitzen LC-CoA und  $\text{PIP}_2$  drei Phosphatgruppen in einer hydrophilen Kopfgruppe und verfügen über einen Fettsäureschwanz als hydrophoben Molekülteil (Abbildung 1.5 und 1.7). Die aktivierende Wirkung von  $\text{PIP}_2$  auf alle Mitglieder der Kir-Familie gilt als etabliert. Im Gegensatz dazu wird angenommen, dass LC-CoA ein spezifischer Aktivator für  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle ist, da andere Kir-Kanäle durch LC-CoA nicht aktiviert werden (Gribble et al. 1998, Rohacs et al. 2003). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Wirkung von LC-CoA keineswegs auf  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle beschränkt ist. Vielmehr zeigt sich, dass LC-CoA eine schnelle und reversible Inhibition aller getesteten Kanäle (Kir1.1,

Kir2.1, Kir3.4, Kir7.1) hervorruft (Abbildung 4.6). Dass diese Inhibition spezifisch für LC-CoA ist, begründen wir u. a. dadurch, dass Substanzen wie Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylcholin (PC), langkettige Fettsäuren (hier Ölsäure) oder CoA keinen Effekt auf Kir2.1-Kanäle besitzen (Abbildung 4.8 B und 4.9). Des Weiteren ist die Potenz der LC-CoA Inhibition an die Länge der Fettsäureseitenkette gebunden (Abbildung 4.8). Eine verlängerte Fettsäureseitenkette resultiert wahrscheinlich in einer erhöhten Hydrophobizität des Moleküls, was eine Akkumulation der Ester in der Membran erleichtert und so die verstärkte Inhibition längerer LC-CoA erklärt. Die Wirkung von LC-CoA auf  $K_{ATP}$ - beziehungsweise Kir-Kanäle scheint durch die 3'-Ribosephosphatgruppe der CoA-Kopfgruppe vermittelt zu werden. Palmitoyl-CoA<sub>Dephospho</sub> (Palmitoyl-CoA ohne 3'-Ribosephosphatgruppe) führte weder zur Aktivierung oder Reduktion der ATP-Empfindlichkeit von  $K_{ATP}$ -Kanälen, noch zu einer Inhibition von Kir1.1-Kanälen (Abbildung 4.10 und 4.11).

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass diese Arbeit ausreichende Indizien dafür aufzeigt, dass LC-CoA neben dem  $K_{ATP}$ - auch an andere Mitglieder der Kir-Familie binden kann und somit in die Regulation aller Kir-Kanäle involviert ist. Damit muss angenommen werden, dass Kir-Kanäle eine gemeinsame Lipidbindungsstelle für PIP<sub>2</sub> und LC-CoA besitzen. Der 3'-Ribosephosphatgruppe von LC-CoA kann dabei eine Schlüsselfunktion für die Interaktion mit Kir-Kanälen zugesprochen werden.

## 5.2. Mechanismus der LC-CoA Inhibition von Kir-Kanälen

Die Mechanismen der Regulation von  $K_{ATP}$ -Kanälen durch  $PIP_2$  und LC-CoA wurden bereits mehrfach untersucht. Für die zugrunde liegenden Vorgänge am Kanalprotein wird angenommen, dass  $PIP_2$  (Oleoyl-CoA) durch einen allosterischen Mechanismus die offene Kanalkonformation stabilisiert und dadurch die ATP-Empfindlichkeit der  $K_{ATP}$ -Kanäle reduziert (Enkvetchakul et al. 2000, Schulze et al. 2003b). Anhand der dreidimensionalen Kristallstruktur von KirBac1.1 und Kir3.1 wurde bereits ein ungefähres Bild einer  $PIP_2$  (Oleoyl-CoA)- beziehungsweise ATP-Bindungsstelle für den  $K_{ATP}$ -Kanal postuliert (Nishida und MacKinnon 2002, Kuo et al. 2003, Enkvetchakul und Nichols 2003).



**Abb. 5.1: Strukturmodell zum “Gating“ des  $K_{ATP}$ -Kanals (Enkvetchakul und Nichols 2003).** In der Struktur des intrazellulären Anteils des Kir3.1-Kanals in der geöffneten Kanalkonformation sind die homologen Aminosäuren der ATP- (blau) und  $PIP_2$ -Bindungsstelle (rot) dargestellt. (Modell: GIRK1 (Nishida and MacKinnon 2002)).

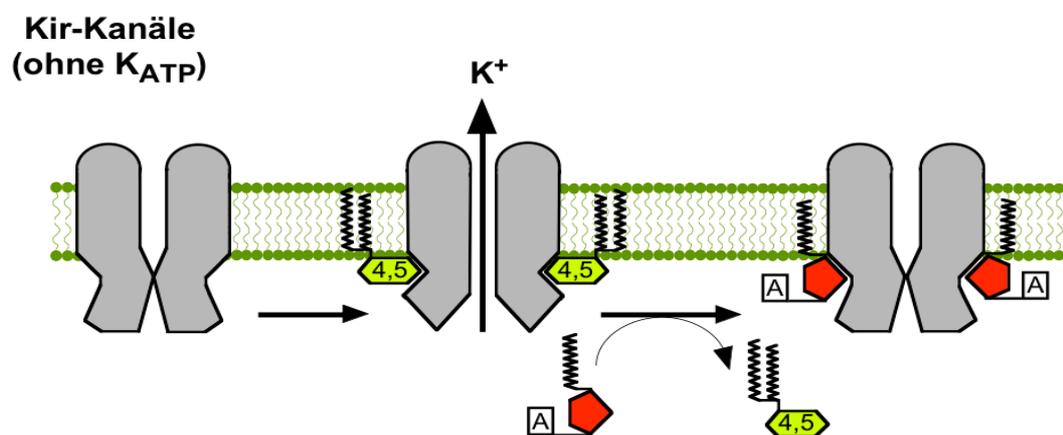
Dabei ist auffällig, dass potentiell  $PIP_2$  (Oleoyl-CoA)-bindende Aminosäurereste des N- und C-Terminus (R54, R176, R177, R206) eine Art Cluster an der Außenseite des

Proteins bilden. Ebenso verhält es sich mit den potentiell ATP-bindenden Resten (R50, K185, I182, G334) (Abbildung 5.1), so dass sich ATP- und PIP<sub>2</sub> (Oleoyl-CoA)-Bindungsstelle in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander befinden, was eine eventuell direkte Interaktion ermöglicht (Enkvetchakul und Nichols 2003). Neben dem K<sub>ATP</sub>-Kanal wurde auch für andere Mitglieder der Kir-Familie die Existenz einer Lipidbindungsstelle postuliert, welche die Aktivierung durch PIP<sub>2</sub> vermittelt (Cukras et al. 2002). Eine Interaktion von LC-CoA mit dieser Lipidbindungsstelle konnte bislang nicht gezeigt werden, da LC-CoA ausschließlich K<sub>ATP</sub>-Kanäle aktiviert (Rohacs et al. 2003).

Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben die Inhibition von Kir-Kanälen durch LC-CoA. Damit muss angenommen werden, dass LC-CoA neben dem K<sub>ATP</sub>-Kanal auch an andere Mitglieder der Kir-Familie binden kann. Die Wirkung von LC-CoA ist sowohl an die Länge der Fettsäureseitenkette, als auch an die Anwesenheit der 3'-Ribosephosphatgruppe gebunden. Unseren Resultaten zufolge unterliegt die LC-CoA Inhibition von Kir-Kanälen und die Aktivierung von K<sub>ATP</sub>-Kanälen derselben molekularen Grundlage (3'-Ribosephosphatgruppe, Fettsäurekettenlänge (am K<sub>ATP</sub>-Kanal durch Manning Fox et al. 2003 gezeigt)) (Abbildung 4.10 und 4.11). Dies impliziert, dass LC-CoA und PIP<sub>2</sub> nicht nur in K<sub>ATP</sub>-Kanälen sondern auch in anderen Kir-Kanälen mit einer gemeinsamen Lipidbindungsstelle interagieren. Diese Annahme bestätigend zeigten unsere Untersuchungen, dass sich die Oleoyl-CoA Inhibition durch eine anschließende Applikation von PIP<sub>2</sub> umkehren lässt (Abbildung 4.12). Außerdem wurde das Ausmaß der Oleoyl-CoA Inhibition durch eine vorherige Applikation von PIP<sub>2</sub> deutlich abgeschwächt (Abbildung 4.13). Eine Kompetetion beider Lipide um eine gemeinsame Lipidbindungsstelle würde diesen Zusammenhang gut erklären. Denkbar wäre, dass LC-CoA zwar an die Lipidbindungsstelle binden kann, dies allerdings nicht

zur Aktivierung führt. Die Inhibition der Kanäle kann daher wahrscheinlich auf eine Verdrängung des Aktivators  $\text{PIP}_2$  durch  $\text{LC-CoA}$  zurückgeführt werden. Eine molekulare Erklärung dieser Unterschiede ist derzeit nicht möglich und erfordert wahrscheinlich die Kristallisation der Lipidbindungsstelle mit  $\text{LC-CoA}$  und  $\text{PIP}_2$ . Interessanterweise führt  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  auch zu einer Inhibition von Kir1.1- und Kir2.1-Kanälen, wohingegen  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  und  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  aktivierend wirken (Abbildung 4.14 und 4.15). Dies impliziert, dass die 5'-Inositolphosphatgruppe von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung von Kir-Kanälen ist. Für eine Kanalbindung ist die 5'-Inositolphosphatgruppe nicht erforderlich, da  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  inhibierend wirkt und daher wahrscheinlich  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  verdrängen kann.

Mit dem folgenden Diagramm soll nochmals der hier etablierte Regulationsmechanismus verdeutlicht werden (Abbildung 5.2).



**Abb. 5.2:** Regulation von Kir-Kanälen durch  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  und  $\text{LC-CoA}$  (Fettsäuren, Ribose und Adeningruppe [A] bzw. Inositol-4,5-bisphosphat sind angedeutet).

Die Abwesenheit von  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  resultiert in einem Verschluss des Kir-Kanals (links), dass Binden von  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  überführt die Kir-Kanäle vom geschlossenen in den geöffneten Zustand (Mitte). Die Verdrängung des Aktivators  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  durch  $\text{LC-CoA}$

führt somit zur Inhibition der Kir-Kanäle (rechts), da LC-CoA selbst nicht im Stande ist eine Aktivierung hervorzurufen.

Wir postulieren, dass die Bindung eines Lipids und die Aktivierung von Kir-Kanälen zwei unterschiedliche Prozesse darstellen. Möglicherweise verfügen die gebundenen Lipide über eine unterschiedliche Fähigkeit eine Aktivierung des Kanals hervorzurufen. Nach dem Binden an eine gemeinsame Lipidbindungsstelle entscheiden möglicherweise kleine Unterschiede in den Wechselwirkung eines gebundenen Lipids mit dem Kanal darüber, ob eine geschlossene – (LC-CoA, PI(3,4)P<sub>2</sub>) oder geöffnete Kanalkonformation (PI(4,5)P<sub>2</sub>, PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) stabilisiert wird.

### **5.3. Physiologische Aspekte**

In einer Reihe von Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von K<sub>ATP</sub>-Kanälen durch Oleoyl-CoA und/ oder Palmitoyl-CoA von physiologischer Relevanz zu sein scheint (Bränström et al. 1997, Gribble et al. 1998, Bränström et al. 2004). In pankreatischen  $\beta$ -Zellen wird das Membranpotential, und damit indirekt auch die Insulinsekretion (siehe Seite 15), hauptsächlich durch die Aktivität der K<sub>ATP</sub>-Kanäle reguliert. Eine chronische Erhöhung des Fettsäurespiegels, beispielsweise bei Adipositas, führt zu einem vermehrten Anfall an intrazellulärem LC-CoA (wie z. B. Oleoyl-CoA und Palmitoyl-CoA) und damit zur Aktivierung von K<sub>ATP</sub>-Kanälen. Daraus könnte eine Verminderung der Insulinsekretion resultieren, was wiederum die Entwicklung eines Diabetes mellitus begünstigen würde. Diese Vermutungen werden durch Experimente von Koster et al. unterstützt, nach deren Aussage die Aktivierung

pankreatischer  $K_{ATP}$ -Kanäle zur Entstehung eines neonatalen Diabetes führen könnte (Koster et al. 2000). Außerdem wurde durch Bränström et al. gezeigt, dass die extrazelluläre Applikation von Fettsäuren in Gegenwart von Glukose - wahrscheinlich über die Bildung von LC-CoA -, zu einer Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen in pankreatischen  $\beta$ -Zellen führt, (Bränström et al. 2004). Dies erscheint plausibel, da Fettsäuren schnell von den Zellen aufgenommen werden können (Hamilton et al. 2001) und die Gegenwart von Glukose zu einer Unterdrückung der  $\beta$ -Oxidation führt, dies würde eine intrazelluläre Anhäufung von LC-CoA zur Folge haben (siehe Seite 21). Des Weiteren sind natürlich vorkommende Mutationen des  $K_{ATP}$ -Kanals bekannt (z. B. E23K, I337V), welche die Affinität des Kanals gegenüber Oleoyl-CoA erhöhen. In Populationen mit einem hohen Anteil dieses Polymorphismus ist überzufällig häufig ein Diabetes mellitus Typ II zu beobachten (Riedel et al. 2003). Damit muss angenommen werden, dass der Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen in pankreatischen  $\beta$ -Zellen durch LC-CoA eine Bedeutung in der Entstehung eines Diabetes mellitus zugesprochen werden kann.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass auch in anderen Geweben eine Modulation der Kir-Kanalaktivität durch LC-CoA von physiologischer Relevanz sein könnte. Herzmuskelzellen verfügen über eine starke Expression an  $K_{ATP}$ -Kanälen, die unter normal-physiologischen Bedingungen durch millimolare ATP-Konzentrationen einer ständigen Inhibition unterliegen. In Situationen einer metabolischen Unterversorgung des Herzens, wie z. B. Hypoxie oder Ischämie, kommt es zu einer Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen (Benndorf et al. 1992). Durch die Zunahme des  $K^+$ -Ausstroms wird die Aktionspotentialdauer verkürzt, und ein vermehrter  $Ca^{2+}$ -Einstrom verhindert. Dieser Mechanismus würde die Überlebenszeit von Herzmuskelzellen verlängern, da der Energieaufwand für  $Ca^{2+}$ -ATPasen oder Actomyosin-ATPase reduziert würde (Liu et al.

2001). Eine Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen durch LC-CoA hätte ähnliche Folgen und repräsentiert eine alternative Möglichkeit den Stoffwechszustand und die elektrische Aktivität von Herzmuskelzellen zu verbinden. Langkettige Fettsäuren, die metabolischen Vorläufer von LC-CoA, dienen der Hauptenergieversorgung des Herzens. Störungen der  $\beta$ -Oxidation, z. B. durch Ischämie, führen möglicherweise zu Änderungen der zytoplasmatischen Konzentration an LC-CoA. Dabei wird die maximale physiologische Konzentration auf etwa 200 nM geschätzt (Knudsen et al. 1999). In den Untersuchungen von Liu et al. führten derartige Konzentrationen zu einer deutlichen Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen und implizieren eine physiologische Bedeutung von LC-CoA in der Regulation der elektrischen Erregbarkeit des Herzens.

Neben  $K_{ATP}$ -Kanälen werden in Kardiomyozyten auch Kir2.1-Kanäle exprimiert. Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zur Folge, könnte ein Anstieg der intrazellulären LC-CoA Konzentration neben einer Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen auch zu einer Inhibition von Kir2.1-Kanälen im Herzen führen. Im Gegensatz zu der kardioprotektiven Wirkung durch die Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen, könnte die LC-CoA Inhibition von Kir2.1-Kanälen pathophysiologische Konsequenzen haben (siehe Seite 19). Kir2.1-Kanäle legen den Schwellenwert zur Auslösung eines Aktionspotentials im Herzen fest, eine Funktionsstörung dieser Kanäle wird mit der Entstehung ventrikulärer Arrhythmien in Verbindung gebracht (Plaster et al. 2001). Die LC-CoA Inhibition von Kir2.1-Kanälen würde die Auslösung von Aktionspotentialen begünstigen und könnte dadurch Arrhythmien hervorrufen.

Die vorliegenden Ergebnisse können als Hinweise dafür angesehen werden, dass zwischen dem Fettsäuremetabolismus und der Aktivität von Kir-Kanälen ein direkter Zusammenhang besteht. Aufgrund der weitreichenden Expression von Kir-Kanälen

könnte durch diesen Mechanismus die elektrische Erregbarkeit verschiedener Zellen beeinflusst werden.

#### **5.4. Strukturelle Implikationen des Gatings von Kir1.1-Kanälen**

Die schwach einwärtsgerichtenden Kir1.1-Kanäle sind von essentieller Bedeutung für die Regulation der Ionentransportvorgänge in der Niere. Die Sekretion von  $K^+$  in das Lumen der Nierentubuli ist nötig, um eine renale  $Na^+$ -Rückresorption zu gewährleisten (siehe Seite 25). Physiologische Stresssituationen, wie z. B. eine metabolische Azidose, führen zum Verschluss von Kir1.1-Kanälen, um einen übermäßigen Verlust an  $K^+$  zu verhindern (Wang et al. 1995). Möglicherweise beruht darauf die hohe Empfindlichkeit von Kir1.1-Kanälen gegenüber pH-Wert Änderungen im physiologischen Bereich, ein Absinken des intrazellulären pH-Wertes führt zum Verschluss -, eine Alkalisierung zur Reaktivierung der Kanäle. Außerdem werden Kir1.1-Kanäle auch durch die Konzentration an extrazellulärem Kalium reguliert. Mehrere Untersuchungen zeigten, dass hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen die Aktivität von Kir1.1-Kanälen stabilisieren, hingegen niedrige extrazelluläre Kaliumkonzentration führen zu einer Reduktion der Kanalaktivität (Doi et al. 1996, Schulte et al. 2001, Sackin et al. 2001). Die molekularen Mechanismen dieser Regulationsphänomene wurden hauptsächlich durch Schulte et al. beschrieben. Es wird angenommen, dass die Protonierung eines Lysins an Position 80 das pH-Gating einleitet und zu Konformationsänderungen im N- und C-Terminus führt. Mutationen an dieser Position, z. B. K80M in Kir1.1, resultieren im Verlust der pH-Empfindlichkeit. Eine Bewegung intrazellulärer Kanaldomänen konnte durch eine zustandsabhängige

chemische Modifikation der Cysteine 49 im N- und 308 im C-Terminus von Kir1.1-Kanälen nachgewiesen werden (siehe Seite 24) (Schulte et al. 1998, Schulte et al. 1999). Die Regulation durch die extrazelluläre Kaliumkonzentration scheint durch das Besetzen einer extrazellulären Kaliumbindungsstelle (im Selektivitätsfilter) des Kanals vermittelt zu werden. Ein Absinken des intrazellulären pH-Wertes in Abwesenheit von extrazellulärem Kalium führt zu einem irreversiblen Verlust der Kanalaktivität (siehe auch Abbildung 4.17). Diese s. g. Kaliuminaktivierung impliziert eine Beteiligung des Selektivitätsfilters am pH-Gating des Kir1.1-Kanals. In der Tat konnten Schulte et al. zeigen, dass die pH-induzierte Kaliuminaktivierung durch Mutationen in der Porenregion aufgehoben werden kann (Schulte et al. 2001).

Mit der vorliegenden Arbeit konnte LC-CoA erstmalig als Inhibitor von Kir1.1-Kanälen identifiziert werden. Im Bezug auf die pH-Regulation war von Interesse, ob die beschriebenen Regulationsphänomene in Kir1.1-Kanälen auch durch die LC-CoA Inhibition hervorgerufen werden können. Alternativ wäre denkbar, dass für verschiedene intrazelluläre Faktoren (pH, LC-CoA, PIP<sub>2</sub>) unterscheidbare Schaltmechanismen existieren um ein Öffnen oder Schließen des Kanals herbeizuführen.

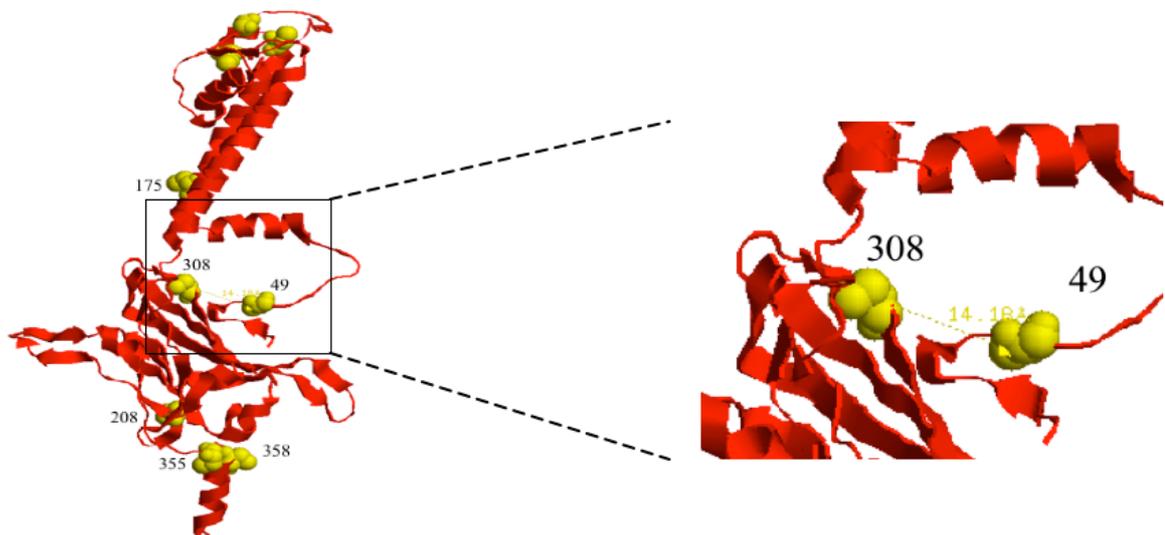
Die Resultate dieser Arbeit implizieren, dass die Regulation von Kir1.1-Kanälen durch LC-CoA (PIP<sub>2</sub>) zu Konformationsänderungen führt, die in ähnlicher Weise auch durch die pH-Inhibition ausgelöst werden können. Dies zeigt sich u. a. darin, dass die Lipidregulation von Kir1.1-Kanälen ebenfalls extrazelluläre Proteinabschnitte involviert, da eine PIP<sub>2</sub>-Depletion (ausgelöst durch LC-CoA oder Poly-Lysin) in Abwesenheit von extrazellulärem Kalium zu einem irreversiblen Verlust der Kanalaktivität führt (Abbildung 4.17 und 4.20). Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die Kaliuminaktivierung an die Spezies des extrazellulären Ions gekoppelt ist. Die LC-CoA Inhibition in Gegenwart von impermeablen Ionen (Na<sup>+</sup>, NMDG<sup>+</sup>) resultiert in

einem irreversiblen Verlust der Kanalaktivität, hingegen bei Verwendung der Ionen  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  und  $\text{K}^+$  konnte die Inhibition nahezu vollständig rückgängig gemacht werden (Abbildung 4.21). Ein ähnliches Verhalten konnten Schulte et al. bereits für die pH-Regulation zeigen (Schulte et al. 2001) und impliziert, dass auch die Vorgänge der Lipidregulation an die Beteiligung einer extrazelluläre  $\text{K}^+$ -Bindungsstelle gekoppelt sind. Diese Annahme bestätigend, konnten Mutationen in der Porenregion (L136I und V140T) neben der pH- auch die durch  $\text{PIP}_2$ -Depletion ausgelöste Kaliuminaktivierung aufheben (Abbildung 4.24). Außerdem führte die Modifikation intrazellulärer Cysteine durch das Oxidationsmittel  $\text{Cu(II)-1,10}$  Phenantrolin zu der Erkenntnis, dass sowohl die pH-Inaktivierung (Abbildung 4.19) als auch die  $\text{PIP}_2$ -Depletion von Bewegungen intrazellulärer Kanaldomänen begleitet werden, welche die Cysteine 49 im N- sowie 308 im C-Terminus involvieren (Abbildung 4.25 und Abbildung 4.26).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Regulation der Aktivität von Kir1.1-Kanälen über eine universelle Gating-Maschinerie vermittelt wird, die sowohl intrazelluläre – (N- und C-Terminus) als auch extrazelluläre Proteinabschnitte ( $\text{K}^+$ -Bindungsstelle) involviert. Ausgelöst durch verschiedene intrazelluläre Faktoren (pH, LC-CoA,  $\text{PIP}_2$ ), führen möglicherweise ähnliche Konformationsänderungen zu denselben geschlossenen Kanalzuständen.

Hier noch einige weitere Gedanken zu den Mechanismen der Konformationsänderungen von Kir1.1-Kanälen. Die Resultate der zustandsabhängigen Cystein Modifikation implizieren, dass möglicherweise die Ausbildung einer Disulfidbrücke erfolgt. Das Oxidationsmittel  $\text{Cu(II)-1,10}$  Phenantrolin (Cu-Phen)

katalysiert die Reaktion zwei benachbarter SH-Gruppen zu einem Disulfid. Möglicherweise führt die Applikation von Cu-Phen im geschlossenen Kanalzustand zur Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen dem Cystein 49 im N- und 308 im C-Terminus. Dies setzt voraus, dass beide Cysteine sich in einem gewissen Abstand zu einander befinden. Die ausbleibende Modifikation im geöffneten Kanalzustand begründet sich wahrscheinlich auf einen zu großen Abstand beider Cysteine. Eine induzierte Konformationsänderung (pH, LC-CoA, PIP<sub>2</sub>) führt zur Annäherung beider Cysteine und erlaubt die Ausbildung einer Disulfidbrücke. Abbildung 5.3 zeigt, dass sich auf einer Kir1.1-Untereinheit sechs intrazelluläre - (Cys49, Cys175, Cys208, Cys308, Cys355, Cys358) und drei extrazelluläre Cysteine befinden. Die Cysteine 49 und 308 befinden sich in dem Strukturmodell (KirBac1.1; Kuo et al. 2003) in räumlicher Nähe, daher erscheint die Ausbildung einer Disulfidbrücke prinzipiell möglich.



**Abb. 5.3: Ansicht einer einzelnen Kir1.1-Untereinheit, in der alle befindlichen Cysteine hervorgehoben sind (gelb). Eine vergrößerte Ansicht zeigt den räumlichen Abstand (14,18 Å zwischen beiden SH-Gruppen) der Cysteine 49 und 308.**

## 6. Literaturverzeichnis

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

Abumrad N, Harmon C and Ibrahimi A. 1998. Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *J Lipid Res*, Dec; 39 (12):2309-18.

Ashcroft FM. 1988. Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu Rev Neurosci*, (11):97-118.

Baukrowitz T, Fakler B. 2000.  $K_{ATP}$  channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *Eur J Biochem*, 267 (19):5842-5848.

Baukrowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitze S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppersberg JP, Fakler B. 1998.  $PIP_2$  and  $PIP$  as determinants for ATP inhibition of  $K_{ATP}$  channels. *Science*, 282 (5391):1141-1144.

Benndorf K, Bollmann G, Friedrich M, Hirche H. 1992. Anoxia induces time-independent  $K^+$  current through  $K_{ATP}$  channels in isolated heart cells of the guinea-pig. *J Physiol*, (454):339-357.

Bichet D, Haass FA and Jan LY. 2003. Merging functional studies with structures of inward-rectifier  $K^+$  channels. *Nat Rev Neurosci*, Dec, 4 (12):957-67.

Bränström R, Leibiger IB, Leibiger B, Corkey BE, Berggren PO, Larsson O. 1998. Long chain coenzyme A esters activate the pore-forming subunit (Kir6.2) of the ATP-regulated potassium channel. *J Biol Chem*, 273 (47):31395-31400.

Bränström R, Aspinwall CA, Välimäki S, Östensson CG, Tibell A, Eckard M, Brandhorst H, Corkey BE, Berggren PO and Larsson O. 2004. Long-chain CoA esters activate human pancreatic beta-cell  $K_{ATP}$  channels: potential role in Type 2 diabetes. *Diabetologia*, (47):277-283.

Cukras CA, Jeliaskova I, Nichols CG. 2002. Structural and functional determinants of conserved lipid interaction domains of inward rectifying Kir6.2 channels. *J Gen Physiol*, 119 (6):581-591.

Deeney JT, Prentki M, Corkey BE. 2000a. Metabolic control of beta-cell function. *Semin Cell Dev Biol*, 11 (4):267-275.

- Deeney JT, Gromada J, Hoy M, Olsen HL, Rhodes CJ, Prentki M, Berggren P-O, Corkey BE. 2000b. Acute Stimulation with Long Chain Acyl-CoA Enhances Exocytosis in Insulin-secreting Cells (HIT T-15 and NMRI beta -Cells). *J Biol Chem*, 275 (13):9363-9368.
- Doi T, Fakler B, Schultz JH, Schulte U, Brändle U, Weidemann S, Zenner HP, Lang F and Ruppertsberg JP. 1996. Extracellular K<sup>+</sup> and Intracellular pH Allosterically Regulate Renal Kir1.1 Channels. *J Biol Chem*, 271 (29):17261-17266.
- Doyle DA, Morais-Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, and MacKinnon R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*, (280):69-77.
- Dumont JN. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol*, 136 (2):153-179.
- Enkvetchakul D, Nichols CG. 2003. Gating mechanism of K<sub>ATP</sub> channels: function fits form. *J Gen Physiol*, 122 (5):471-480.
- Enkvetchakul D, Loussouarn G, Makhina E, Shyng SL, Nichols CG. 2000. The kinetic and physical basis of K(ATP) channel gating: toward a unified molecular understanding. *Biophys J*, 78 (5):2334-2348.
- Faergeman NJ and Knudsen J. 1997. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J*, (323):1-12.
- Fakler B, Brandle U, Glowatzki E, Weidemann S, Zenner HP, Ruppertsberg JP. 1995. Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K<sup>+</sup> channels is caused by intracellular spermine. *Cell*, 80 (1):149-154.
- Fakler B, Schultz JH, Yang J, Schulte U, Brandle U, Zenner HP, Jan LY, Ruppertsberg JP. 1996. Identification of a titratable lysine residue that determines sensitivity of kidney potassium channels (ROMK) to intracellular pH. *EMBO J*, 15 (16):4093-4099.
- Fan Z, Makielski JC. 1997. Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem*, 272 (9):5388-5395.
- Fulceri, R., Nori, A., Gamberucci, A., Volpe, P., Giunti, R., and Benedetti, A. 1994. *Cell Calcium*, (15):109-116.
- Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. 1998. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem*, (67):481-507.

- Gribble FM, Proks P, Corkey BE, Ashcroft FM. 1998. Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA. *J Biol Chem*, 273 (41):26383-26387.
- Hamilton JA, Johanson RA, Corkey BE, Kamp F. 2001. Fatty acid transport: the diffusion mechanism in model and biological membranes. *J Mol Neurosci*, (16):99-108.
- Hebert SC. 1995. An ATP-regulated, inwardly rectifying potassium channel from rat kidney (ROMK). *Kidney Int*, 48 (4):1010-1016.
- Hilgemann DW, Ball R. 1996. Regulation of cardiac  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  exchange and  $\text{K}_{\text{ATP}}$  potassium channels by  $\text{PIP}_2$ . *Science*, 273 (5277):956-959.
- Hilgemann DW, Feng S, Nasuhoglu C. 2001. The complex and intriguing lives of  $\text{PIP}_2$  with ion channels and transporters. *Sci STKE*, 2001 (111):Re19.
- Huang C, Feng S, Hilgemann D. 1998. Direct activation of inward rectifier potassium channels by  $\text{PIP}_2$  and its stabilization by Gbetagamma. *Nature*, 391 (6669):803-806.
- Jiang Y, Lee A, Chem J, Cadene M, Chait BT and MacKinnon R. 2002. The open pore conformation of potassium channels. *Nature*, 417 (6888):523-526.
- Knudsen J, Jensen MV, Hansen JK, Faergeman NJ, Neergaard TBF and Gaigg B. 1999. Role of acyl-CoA binding protein in acyl-CoA transport, metabolism and cell signaling. *Mol Cell Biochem*, (192):95-103.
- Kobrinisky E, Mirshahi T, Zhang H, Jin T and Logothetis DE. 2000. Receptor-mediated hydrolysis of plasma membrane messenger  $\text{PIP}_2$  leads to  $\text{K}^+$ -current desensitization. *Nat Cell Biol*, Aug; 2 (8):507-14.
- Koster JC, Marshall BA, Ensor N, Corbett JA and Nichols CG. 2000. Targeted overactivity of beta cell  $\text{K}(\text{ATP})$  channels induces profound neonatal diabetes. *Cell*, (100):645-654.
- Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, Doyle DA. 2003. Crystal Structure of the Potassium Channel KirBac1.1 in the Closed State. *Science*, 300 (5627):1922-1926.
- Larsson O, Deeney JT, Bränström R, Berggren PO, Corkey BE. 1996. Activation of the ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel by long chain acyl-CoA. A role in modulation of pancreatic beta-cell glucose sensitivity. *J Biol Chem*, 271 (18):10623-10626.

Liu GX, Hanley PJ, Ray J, Daut J. 2001. Long-chain acyl-coenzyme A esters and fatty acids directly link metabolism to K(ATP) channels in the heart. *Circ Res*, 88 (9):918-924.

Löffler G, Petrides PE. 2002. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7te Aufl. Berlin: Springer Verlag.

Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ and Clapham DE. 1987. The  $\beta\gamma$  subunit of GTP-binding proteins activate the muscarinic K channel in the heart. *Nature* 325: 321-326.

Lopes C, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis D. 2002. Alterations in conserved Kir channel-PIP2 interactions underlie channelopathies. *Neuron/ Comment in: Neuron* 2002 Aug 1;35(3):411-2, 34 (6):933-944.

Manning Fox JE, Magga J, Giles WR, Light PE. 2003. Acyl coenzyme A esters differentially activate cardiac and beta-cell adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in a side-chain length-specific manner. *Metabolism*, 52 (10):1313-1319.

Manning Fox JE, Nichols CG, Light PE. 2004. Activation of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels by acyl coenzyme A esters involves multiple phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-interacting residues. *Mol Endocrinol*, 18 (3):679-686.

Nishida M, MacKinnon R. 2002. Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell*, 111 (7):957-965.

Oliver D, Baukrowitz T, Fakler B. 2000. Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem*, 267 (19):5824-5829.

Perozo E, Cortes DM, and Cuello LG. 1998. Threedimensional architecture and gating mechanism of a K<sup>+</sup> channel studied by EPR spectroscopy. *Nat Struc Biol*, (5):459-469.

Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canun S, Bendahhou S, Tsunoda A, Donaldson MR, Iannaccone ST, Brunt E, Barohn R, Clark J, Deymeer F, George AL, Jr., Fish FA, Hahn A, Nitu A, Ozdemir C, Serdaroglu P, Subramony SH, Wolfe G, Fu YH, Ptacek LJ. 2001. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell*, 105 (4):511-519.

Riedel MJ, Boora P, Steckley D, de Vries G, Light PE. 2003. Kir6.2 Polymorphisms Sensitize  $\beta$ -Cell ATP-Sensitive Potassium Channels to Activation by Acyl CoAs: A Possible Cellular Mechanism for Increased Susceptibility to Type 2 Diabetes? *Diabetes*, 52 (10):2630-2635.

- Rohacs T, Chen J, Prestwich GD, Logothetis DE. 1999. Distinct specificities of inwardly rectifying K(+) channels for phosphoinositides. *J Biol Chem*, 274 (51):36065-36072.
- Rohacs T, Lopes CMB, Jin T, Ramdya PP, Molnar Z, Logothetis DE. 2003. Specificity of activation by phosphoinositides determines lipid regulation of Kir channels. *PNAS*, 100 (2):745-750.
- Sackin H, Syn S, Palmer LG, Choe, H and Walters DE. 2001. Regulation of ROMK by extracellular cations. *Biophysical Journal*, (80):683-697.
- Schulte U, Hahn H, Wiesinger H, Ruppertsberg JP and Fakler B. 1998. pH-dependent gating of ROMK (Kir1.1) Channels Involves Conformational Changes in Both N and C Termini. 1998. *J Biol Chem*, 273(18):34575-34579.
- Schulte U, Hahn H, Konrad M, Jeck N, Derst C, Wild K, Weidemann S, Ruppertsberg JP, Fakler B, Ludwig J. 1999. pH gating of ROMK (Kir1.1) channels: Control by an Arg-Lys-Arg triad disrupted in antenatal Bartter syndrome. *PNAS*, 96 (26):15298-15303.
- Schulte U, Weidemann S, Ludwig J, Ruppertsberg JP and Fakler B. 2001. K<sup>+</sup>-dependent gating of Kir1.1 channels is linked to pH gating through a conformational change in the pore. *J Physiol*, (534.1):49-58.
- Schulze D, Krauter T, Fritzenschaft H, Soom M, Baukrowitz T. 2003a. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) Modulation of ATP and pH Sensitivity in Kir Channels. A Tale of an active and a silent PIP<sub>2</sub> site in the N-terminus. *J Biol Chem*, 278 (12):10500-10505.
- Schulze D, Rapedius M, Krauter T, Baukrowitz T. 2003b. Long-chain acyl-CoA esters and phosphatidylinositol phosphates modulate ATP inhibition of K<sub>ATP</sub> channels by the same mechanism. *J Physiol*, (552.2):357-367.
- Shyng SL, Cukras CA, Harwood J and Nichols CG. 2000. Structural Determinants of PIP<sub>2</sub> Regulation of Inward Rectifier K<sub>ATP</sub> Channels. *J Gen Physiol*. (116):599-607.
- Seino S. 1999. ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu Rev Physiol*, (61):337-362.
- Sugden MC and Holness MJ. 1994. Interactive regulation of the pyruvate dehydrogenase complex and the carnitine palmitoyltransferase system. *FASEB J*, Jan; 8 (1):54-61.
- Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, Ashcroft FM. 1997. Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature*, 387 (6629):179-183.

- Trube G, Rorsman P and Ohno-Shosaku T. 1986. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent  $K^+$ -channel in mouse pancreatic beta-cells. *Pflügers Arch. Nov*, 407(5):493-9.
- Vivaudou M, Chan KW, Sui JL, Jan LY, Reuveny E and Logothetis DE. 1997. Probing the G-protein regulation of GIRK1 and GIRK4, the two subunit of the KACH channel, using functional homomeric mutants. *J Biol Chem*, 272 (50):31553-60.
- van der Vusse GJ, Glatz JF, Stam HC, Reneman RS. 1992. Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev*, 72 (4):881-940.
- Wang W, Sackin H, Giebisch G. 1992. Renal potassium channels and their regulation. *Annu Rev Physiol*, (54):81-96.
- Wang WH. 1995. View of  $K^+$  secretion through the apical K channel of the cortical collecting duct. *Kidney Int*, (48):1024-1030.
- Xie LH, Takano M, Kakei M, Okamura M, Noma A. 1999. Wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol kinases, blocks the MgATP-dependent recovery of Kir6.2/SUR2A channels. *J Physiol*, (514.3):655-665.
- Xu ZC, Yang Y, Hebert SC. 1996. Phosphorylation of the ATP-sensitive, inwardly rectifying  $K^+$  channel, ROMK, by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 271 (16):9313-9319.
- Zammit VA. 1999. The malonyl-CoA-long-chain acyl-CoA axis in the maintenance of mammalian cell function. *Biochem J*, (343.3):505-515.
- Zhou Y, Morais-Cabral J, Kaufman A and MacKinnon R. 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K channel Fab complex at 2.0Å resolution. *Nature*, (414):43-48.

## 7. Summary

Long chain esters of Coenzyme A (LC-CoA) are potent activators of ATP-sensitive ( $K_{ATP}$ ) channels and elevated levels have been implicated in the pathophysiology of type 2 diabetes. This stimulatory effect is thought to involve a mechanism similar to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ( $PIP_2$ ) which activates all known Kir-channels. However, the effect of LC-CoA on other members of the inwardly-rectifying (Kir) family of potassium channels has not been well characterised. In this study, we show that in contrast to their stimulatory effect on  $K_{ATP}$ -channels, LC-CoA (e. g. oleoyl-CoA) potently and reversibly inhibits all other Kir-channels tested (Kir1.1, Kir2.1, Kir3.4, Kir7.1). We also demonstrate that the inhibitory potency of the LC-CoA increases with the chain length of the fatty acid chain, whilst both its activatory and inhibitory effects critically depend on the presence of the 3'ribose phosphate on the CoA group.  $PIP_2$  reversed and attenuated the inhibitory effect of oleoyl-CoA suggesting that the mechanism of inhibition involves a competitive displacement of  $PIP_2$ . These results demonstrate a bi-directional modulation of different Kir-channel activity by LC-CoA and imply that changes in fatty acid metabolism (e. g. LC-CoA production) could have profound and widespread effects on cellular electrical excitability.

Besides lipid modulation, Kir-channel activity is also regulated by various factors such as ATP,  $G_{\beta\gamma}$ -proteins and changes in the intracellular pH. This regulation is central to their physiological function and is found to be defective in many disease states.

For Kir-channels, the binding of various ligands to different intracellular sites determines whether to open ( $PIP_2$ ,  $G_{\beta\gamma}$ -proteins) or close (ATP,  $H^+$ , LC-CoA) the channel pore. The molecular mechanisms underlying these gating processes are

currently not well understood. Therefore, aim of this study was to investigate how channels move between their open and closed states.

The use of cysteine modification and mutagenesis revealed, that PIP<sub>2</sub>-depletion (e. g. LC-CoA inhibition) is associated with structural movements involving both intra- and extracellular parts of the channel protein. Further experiments identified the selectivity-filter of Kir1.1-channels as part of the “gating-machinery” mediating transitions between open and closed states. The study was conducted comparatively, showing the same regulation phenomena for pH- and lipid-gating (PIP<sub>2</sub>, LC-CoA).

From this it was postulated, that binding of various ligands induces similar conformational changes in Kir1.1 and shares a conserved structural mechanism to regulate channel activity.

The results of this study were published:

Schulze D, Rapedius M, Krauter T und Baukrowitz T. 2003. Long-chain acyl-CoA esters and phosphatidylinositol phosphates modulate ATP inhibition of K<sub>ATP</sub> channels by the same mechanism. *J Physiol*, (552.2): 357–367.

Rapedius M, Soom M, Shumilina E, Schulze D, Lang F, Schonherr R, Tucker SJ and Baukrowitz T. 2005. Long chain CoA esters as competitive antagonists of PIP<sub>2</sub> activation in Kir channels. *J Biol Chem*, 280(35): 30760-7.

## **8. Anhang**

### **Danksagung**

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Oelschläger, der durch seinen Einsatz die Zulassung zur Promotion an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät ermöglichte. Prof. Dr. Bolz danke ich für die externe Betreuung an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät und Prof. Dr. Heinemann für die Aufnahme in das Graduierten Kolleg "Biomolekulare Schalter".

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Benndorf, dass ich in seinem Institut ungehindert meinen Forschungen nachgehen konnte. Ich möchte mich auch bei den technischen Mitarbeiterinnen und allen Kollegen für die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Im besonderen Maße gilt mein Dank Sonja Rabe und Birgit Tietsch, die durch Bereitstellung hervorragender Oozyten, Pipetten und Lösungen die Grundlage meine Experimente schafften. Dr. Hariolf Fritzenschaft danke ich für die Bereitstellung der RNA, das Korrekturlesen des Manuskripts und für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen, für die ich mich auch bei Dirk Schulze ganz besonders erkenntlich zeigen möchte. Ohne euch wären der Arbeit viele lustige Stunden verloren gegangen.

Mein größter Dank gilt jedoch meinem Doktorvater, Betreuer und wissenschaftlichen Mentor Prof. Dr. Thomas Baukrowitz, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Seine unermüdliche Hilfe und "doktorväterliche" Fürsorge in allen Phasen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Nicht zuletzt gilt mein persönlicher Dank Jana, meiner Familie und meinen Freunden die mir allzeit Vertrauen und Unterstützung entgegenbrachten.

## Lebenslauf

- Name: Markus Rapedius
- Geburtstag: 06.07.1974
- Geburtsort: Bernkastel-Kues
- Nationalität: deutsch
- 
- 1981 – 1985: Grundschule Zeltingen-Rachtig
- 1985 – 1991: Realschule Bernkastel-Kues
- 1991 – 1994: BASF AG Ludwigshafen; Berufsausbildung zum Chemikant
- 1994 – 1996: BASF AG Ludwigshafen; Berufstätigkeit als Chemikant
- 1996 – 1997: Fachschule Naturwissenschaften Trier; Erwerb der Fachhochschulreife
- 1997 – 2001: Fachhochschule Isny; Studium der pharmazeutischen Chemie mit Abschluss als Diplom-Ingenieur (Fh)
- 2000 – 2001: University of Arizona, Tucson; Diplomarbeit im College of Pharmacy bei Prof. Dr. J. Blanchard zum Thema “Comparison of the hanson microette and the Van Kel apparatus for in vitro release testing of semisolid formulations”; Pharm Res. 2001 Oct, 18 (10): 1440-7
- 2002 – 2005: Friedrich-Schiller-Universität Jena; Doktorarbeit an der Physiologie II mit dem Titel “Modulation einwärtsgerichteter Kaliumkanäle durch langkettige Fettsäureester mit Coenzym A” unter Anleitung von Prof. Dr. T. Baukrowitz

Jena, 14.07.05

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass

mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Thomas Baukrowitz,

ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe,

Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen

und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 03.05.06

Markus Rapedius, Verfasser