

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Ionenkanäle	1
1.1.1.	Kaliumkanäle (Struktur, Klassifizierung, Nomenklatur)	3
1.1.1.1.	Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (2 TMs / 1 P)	6
1.1.1.2.	Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (6 TMs / 1 P)	7
1.1.1.3.	Zwei-Porendomänen Kaliumkanäle (4 TMs / 2 Ps)	9
1.1.1.3.1.	K _{2P} 2.1 (TREK-1) und K _{2P} 10.1 (TREK-2) – Expression, Regulation sowie physiologische und pathophysiologische Relevanz	12
1.1.1.3.2.	Der Carboxyl-Terminus als essentieller Bestandteil der Kanalregulation	19
1.1.1.3.3.	Ein Gen, viele Kanalproteine – der Proteindiversität zugrunde liegende Mechanismen	22
1.2.	Akzessorische β-Untereinheiten	26
	Die Familie der Kv β -Untereinheiten	26
1.3.	Der β-Adrenozeptor Antagonist Carvedilol	28
1.4.	Modellorganismus <i>Xenopus laevis</i>	31
	<i>Xenopus laevis</i> Oozyten als Expressionssystem	33
1.5.	Elektrophysiologie	35
1.6.	Fragestellungen und Zielsetzung der Dissertation	37
1.6.1.	Haben Kv β -Untereinheiten einen regulatorischen Effekt auf Zwei-Porendomänen Kaliumkanäle?	37
1.6.2.	Inwieweit kommt der Kozak-Sequenz bei der differenziellen Ausbildung der ATI-Varianten bei K _{2P} 10.1 eine regulatorische und funktionelle Bedeutung zu?	38
1.6.3.	Werden K _{2P} 2.1 und K _{2P} 10.1 pharmakologisch durch den kombinierten (α_1 -, β_1 -, β_2 -) Adrenozeptor Antagonisten Carvedilol beeinflusst?	39
2.	Material und Methoden	40
2.1.	Material	40
2.1.1.	Geräte	40

2.1.2.	Gebrauchsmaterialien	43
2.1.3.	Verbrauchsmaterialien	44
2.1.4.	Chemikalien	45
2.2.	Methoden	49
2.2.1.	Molekularbiologie	49
2.2.1.1.	Transformation	52
2.2.1.2.	Mini-Präparation	53
2.2.1.3.	Maxi-Präparation	55
2.2.1.4.	Linearisierung	56
2.2.1.5.	<i>In vitro</i> Transkription	58
2.2.1.6.	Subklonierung von Nukleinsäurefragmenten	60
2.2.1.7.	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)	63
2.2.1.7.1.	Einfügen akzessorischer "tag" zur Proteinmarkierung	64
2.2.1.7.2.	<i>In vitro</i> Mutagenese	68
2.2.1.7.3.	Deletion des N-Terminus	70
2.2.1.7.4.	Expressionsanalyse der hK _{2P} 10.1 Isoformen 1-3 mittels organspezifischer cDNA libraries	72
2.2.2.	Kultur und Präparation der biologischen Materialien	74
2.2.2.1.	<i>Xenopus laevis</i> (Afrikanischer Krallenfrosch)	74
2.2.2.1.1.	Entnahme und Präparation der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	74
2.2.2.1.2.	Mikroinjektion von mRNA in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	76
2.2.2.1.3.	Proteinextraktion aus <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	77
2.2.2.2.	Humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells, HEK293)	78
2.2.2.2.1.	Kultivierung von HEK293	78
2.2.2.2.2.	Transiente Transfektion von HEK293 Zellen	80
2.2.2.2.3.	Proteinextraktion aus HEK293 Zellen	81
2.2.3.	Elektrophysiologie	82
2.2.3.1.	Prinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (voltage-clamp)	82
2.2.3.1.1.	Angewendete Spannungsprotokolle	84
2.2.3.2.	Patch-clamp Technik	85
2.2.3.2.1.	Angewendete Spannungsprotokolle	87
2.2.3.3.	Auswertung und Statistik	87
2.2.4.	Biochemische Untersuchungsmethoden	88

2.2.4.1.	Gelelektrophorese und Western Blot	88
2.2.4.2.	Co-Immunopräzipitation	92
2.2.4.3.	Biotinylierung	94
3.	Ergebnisse	97
3.1.	Regulation des rattenspezifischen rK_{2P}2.1 Kanals durch rattenspezifische rKvβ-Untereinheiten	97
3.1.1.	Modifizierung der Amplitude von rK _{2P} 2.1 Strömen durch Coexpression von rKv β 2 Untereinheiten	97
3.1.2.	Biophysikalische Effekte der rKv β 2 Untereinheit auf transmembranale rK _{2P} 2.1 Ströme	100
3.1.3.	Coexpression von rKv β 2 mit rK _{2P} 2.1 Translationsvarianten	102
3.1.4.	Nachweis einer direkten Protein-Protein Interaktion zwischen rK _{2P} 2.1 und rKv β 2	104
3.1.5.	Modulation der Oberflächenexpression von rK _{2P} 2.1 durch Coexpression von rKv β 2	105
3.1.6.	Beeinflussung transmembranaler rK _{2P} 2.1 Ströme durch rKv β 1, rKv β 3 und rKv β 4	106
3.2.	Genetische Regulation der hK_{2P}10.1 ATI-Varianten durch die Kozak-Sequenz	109
3.2.1.	Gewebespezifische Expression der hK _{2P} 10.1 Spleißvarianten	109
3.2.2.	Biochemische Charakterisierung von hK _{2P} 10.1 mittels Western Blot Analyse	110
3.2.3.	Rekombination der Translationsinitiationssequenz	113
3.2.4.	Nachweis der ATI in transfizierten Säugetierzellen (HEK293)	114
3.2.5.	Funktionelle Charakterisierung der hK _{2P} 10.1 Spleißvarianten in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	116
3.2.6.	Funktionelle Charakterisierung einzelner hK _{2P} 10.1 α -Untereinheiten der verschiedenen Spleißvarianten	118
3.3.	Pharmakologische Regulation von hK_{2P}2.1 und hK_{2P}10.1 durch Carvedilol	120
3.3.1.	Inhibition der humanen hK _{2P} 2.1 und hK _{2P} 10.1 Kanäle durch Carvedilol in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	120
3.3.2.	Sensitivität der in kultivierten HEK293 Zellen exprimierten hK _{2P} 2.1 und hK _{2P} 10.1 Kanäle für Carvedilol	127

3.3.3.	Pharmakologisch differentielle Regulation der hK _{2P} 2.1 und hK _{2P} 10.1 ATI-Varianten in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	129
3.3.4.	Überprüfung des DMSO- und Zeit-Einflusses	135
4.	Diskussion	137
4.1.	Aktivierung von rK_{2P}2.1 durch rKvβ-Untereinheiten	137
4.1.1.	Physiologische Bedeutung und potentielle klinische Anwendungsmöglichkeit	140
4.1.2.	Kritische Beurteilung der verwendeten Methodik und Ausblick	140
4.1.3.	Schlußfolgerungen	141
4.2.	Alternatives Spleißen reguliert die mRNA Translations-initiation und die Funktion von hK_{2P}10.1 Kaliumkanälen	141
4.2.1.	Gewebsspezifische Expression der K _{2P} 10.1 Isoformen	142
4.2.2.	hK _{2P} 10.1 unterliegt der ATI	143
4.2.3.	Spleißen reguliert durch Rekombination einer kurzen 5' Nukleotidsequenz die hK _{2P} 10.1 mRNA Translationsinitiation.	144
4.2.4.	ATI ist auch in Säugetierzellen nachweisbar	144
4.2.5.	Funktionelle Auswirkungen der ATI	145
4.2.6.	Schlussfolgerungen	147
4.3.	Konzentrationsabhängige Inhibition von hK_{2P}2.1 und hK_{2P}10.1 durch Carvedilol	147
4.3.1.	Biophysikalische Eigenschaften der hK _{2P} 2.1 Hemmung durch Carvedilol	148
4.3.2.	ATI beeinflusst die pharmakologische Sensitivität von K _{2P} -Kanälen	149
4.3.3.	Pharmakologische Inhibition von K _{2P} -Kanälen als therapeutischer Ansatz	151
4.3.4.	Schlussfolgerungen	152
4.4.	Resümee und Ausblick	153
5.	Zusammenfassung	155
6.	Summary	159
7.	Literaturverzeichnis	162
8.	Abbildungsverzeichnis	187
9.	Tabellenverzeichnis	189

10.	Publikationsliste	190
10.1.	Originalarbeiten	190
10.2.	Übersichtsartikel	191
11.	Danksagung	192
12.	Erklärung	194