Universität Ulm
Institut für Angewandte Physiologie
Prof. Dr. Birgit Liss

Der elektrophysiologische Nachweis der Interaktionen von Endophilin 3 mit dem Ca^{2+}-aktivierten Kaliumkanal, *h*SK3

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Mohamed Abo Quader
aus Ulm
2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Grissmer
2. Berichterstatter: Dr. Karl Föhr

Tag der Promotion: 26.06.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis vi
1. Einleitung 1
1.1 Der Ca^{2+} aktivierte K^+ Kanal, *h*SK3 1
1.1.1 Familie des *h*SK3 Kanals 1
1.1.2 Struktur des hSK3 Kanals 3
1.1.3 Vorkommen des *h*SK3 Kanals 4
1.1.4 Funktion des *h*SK3 Kanals 5
1.2 *h*SK3 Kanalaktivierung durch DC-EBIO 7
1.3 Endophilin 3 9
1.3.1 Familie und Struktur 9
1.3.2 Vorkommen und Funktion 11
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit 13
3. Material und Methoden 14
3.1 Molekularbiologie 14
3.1.1 Lösungen und Reagenzien 14
3.1.2 DNA-Klone und Bakterienstämme 14
3.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration 16
3.2 Zellkultur 16
3.2.1 Lösungen und Reagenzien 16
3.2.2 Kultivierung der PC12 Zellen 16
3.2.3 Transfektion mit Plasmid-DNA 17
3.2.4 Vorbereitung der Zellen für die elektrophysiologischen Messungen 17
3.3 Elektrophysiologie 18
3.3.1 Lösungen und Reagenzen 18
3.3.2 Aufbau der Patch-Clamp-Apparatur 19
3.3.3 Versuchsdurchführung 20
3.3.4 Auswertung der Daten 21
4. Ergebnisse 22
4.1 Endogene Ströme durch *h*SK3 Kanäle in PC12 Zellen in Kontrollexperimenten 23
4.2 Endogene *h*SK3 Ströme in PC12 Zellen in Kontrollexperimenten in Anwesenheit von Cs^+-Lösung 25
4.3 Endogene Ströme durch *h*SK3 Kanäle in PC12 Zellen in Anwesenheit von Endophilin 3 27
4.4 Überprüfung ob eine *h*SK3-Endophilin 3- Interaktion möglicherweise die Kanalaktivierung endogener *h*SK3 Kanäle in PC12 Zellen durch DC-EBIO beeinflusst? 29

4.4.1 Die Kanalaktivierung endogener *h*SK3 Kanäle in PC12 Zellen durch DC-EBIO in Kontrollexperimenten 29
4.4.2 Die Kanalaktivierung endogener *h*SK3 Kanäle in Endophilin 3 transfizierten PC12 Zellen durch DC-EBIO 33
5. Diskussion 39
5.1 Der elektrophysiologische Nachweis der Interaktion von Endophilin 3 mit *h*SK3 Kanälen..... 39
5.2 Mechanismus der Interaktion von Endophilin 3 mit *h*SK3 Kanälen..... 41
5.3 Die Rolle von Endophilinen bei der Endozytose 40
5.4 Bedeutung und Funktion der Interaktion von dem Endophilin 3 mit *h*SK3 Kanälen 43
5.5 Beispiel für Protein-Ionenkanal-Interaktion und deren Bedeutung für die Kanalaktivierung aus der Literatur 43
6. Zusammenfassung 46
7. Literaturverzeichnis 48
Danksagung **.....** 48
Lebenslauf **.....** 59
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis **.....** 60

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
1-EBIO	1-ethyl-2-benzimidazolinone
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Ca^{2+}	Calciumionen
$CaCl_2$	Kalziumchlorid
CAG	Cytosin-Adenin-Guanin-Basentriplett
CaM	Calmodulin
CaMBD	Calmodulin-Bindedomäne
cDNA	komplemetäre DNA
DC-EBIO	5,6-dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro 2*H*-benzimidazol-2-one
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
C-Terminus	umfasst den zytoplasmatisch C-Terminalen Abschnitt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EGY48	Hefestamm
et al.	und andere (et alii)
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
g/l	Gramm pro Liter
h	menschlich (human)
h	Stunde
HS	Pferdeserum
*h*SK3	Humaner Ca^{2+} aktivierter K^+ Kanal kleiner Leitfähigkeit 3
IK1, SK4	Ca^{2+}-gesteuerter K^+-Kanal mit mittlerer Leitfähigkeit
K^+	Kaliumion
Kb	Kilobasen
Kv	spannungsgesteuerter K^+-Kanal
l	Liter
L	Leucin
LB	Bakterienmedium (Luria-Bertani Medium)
LPAAT	Lysophosphatidic acid acyl transferase activity
LTP	long term potentiation Langzeitpotenzierung
M	Molar
mA	Milliampere
max.	maximal
mg	Milligramm (1×10^{-3}g)
min	Minute
ml	Milliliter
ml/l	Milliliter pro Liter
mRNA	Messenger RNA
µl	Mikroliter
n	beliebige Zahl

GFP	green fluorescent protein
N-C Interaktion	Interaktion zwischen den zytoplasmatisch N-terminalen und C-terminalen Abschnitten
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NTC	Non-treated-Kontrolle
N-Terminus	umfasst den zytoplasmatisch N-Terminalen Abschnitt
OD_n	optische Dichte bei Wellenlänge λ = n
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pS	Picosiemens (1 x 10^{-12} Siemens)
PXXP	Aminosäuresequenz, N- und C-terminal von einem Prolin begrenzt
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
S1-S6	Transmembranäre Segmente 1 – 6 bei K^+-Kanälen
SD	Standartabweichung
SH3	Src homology 3
SH3GL3	Src homology 3 containing Grb2-like protein 3
SK1-3, KCNN1-3	SK1-3,Ca^{2+}-gesteuerter K^+-Kanal mit kleiner Leitfähigkeit 1-3
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TYGPN	Bakterienmedium
UV	ultraviolett
V	Spannung in Volt
v/v	Volumen pro Volumen
XL1-Blue	Bakterienstamm
YPD	Hefemedium

1. Einleitung

Die Zelle wird von ihrer äußeren Umgebung sowie von anderen Zellen durch die Zellmembran abgegrenzt. Die Zellmembran, eine Schicht aus Lipiden, dient als unüberwindbare Barriere für Ionen und wasserlösliche Substanzen.

Mit Hilfe von Ionenkanälen können Ionen und polare Moleküle die Zellmembran passieren. Bei den Ionenkanälen handelt es sich um Proteine, die in der Membran verankert sind und hochselektive Poren besitzen können. Die Selektivität dieser Ionenkanäle kann so sein, dass sie nur für bestimmte Ionen, z.B. K^+, Ca^{2+}, Cs^+ usw. permeabel sind. Darüber hinaus lassen sich die meisten Ionenkanäle gezielt steuern, sie öffnen und schließen sich als Antwort auf bestimmte Stimuli. So kann eine Öffnung eines Ionenkanals, auch als Aktivierung bezeichnet, durch eine Substanz, Aktivator, zustande kommen. Eine Substanz, die die Pore des Ionenkanals verstopft und somit verhindert, dass Ionen durch den Kanal fliesen, wird als Blocker bezeichnet.

Zum einen werden die Ionenkanäle durch ihre Aktivatoren bzw. Blocker und zum anderen durch ihre Leitfähigkeiten charakterisiert. Diese Eigenschaften der Ionenkanäle können modifiziert werden und beeinflussen dadurch viele Eigenschaften der gesamten Zelle. In dieser Arbeit wird die in Hefe nachgewiesene Interaktion zwischen einem Ionenkanal, dem Ca^{2+} aktivierten K^+ Kanal, *h*SK3, und dem Protein Endophilin 3 elektrophysiologisch charakterisiert. Die folgende Einleitung beschäftigt sich im ersten Teil mit der Familie, Struktur, Vorkommen und Funktion der *h*SK3-Kanäle. Der zweite Teil soll einen Einblick über Endophilin 3 verschaffen.

1.1 Der Ca^{2+} aktivierte K^+ Kanal, *h*SK3

1.1.1 Familie des *h*SK3 Kanals

Der *h*SK3 Kanal gehört der großen Familie der Ca^{2+} aktivierten K^+ Kanälen an. Dieser Familie ist gemeinsam, dass sie durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration aktiviert, d.h. geöffnet werden. Ob diese Kanäle geschlossen bzw. geöffnet sind, wird durch die freie zytosolische Calciumkonzentration gesteuert.

Seit ihrer Entdeckung, 1958 in Erythrozyten, wurden sie noch in vielen verschiedenen Zelllinien und Geweben nachgewiesen. Basierend auf Ergebnissen

aus Einzelkanalmessungen und Untersuchungen mit spezifischen Toxinen sowie anhand Ihrer Genkodierung wurden die Ca^{2+} aktivierten K^+ Kanäle in 2 Gruppen bzw. 3 Gruppen (früher) unterteilt. Die KCNM-Familie (früher BK Kanäle) und die KCNN-Familie (früher IK und SK Kanäle).

BK Kanäle, auch „big conductance Ca^{2+} activated K^+ channels“ genannt, haben, Einzelkanalmessungen zufolge, mit bis zu 250 pS die größte Einzelkanalleitfähigkeit unter den Ca^{2+} aktivierten K^+ Kanälen (Pallotta *et al.*, 1981). Ein besonderes Merkmal dieser Kanäle ist, dass ihr Öffnungsmechanismus nicht allein von der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration, sondern auch vom Membranpotential abhängig ist.

Die BK Kanäle gehören einer eigenen Genfamilie an, die vom *KCNMA1* Gen kodiert werden.

Die zweite Gruppe stellen die IK Kanäle dar. Sie besitzen mit 20-40 pS eine mittlere Einzelkanalleitfähigkeit in der Familie der Ca^{2+} aktivierten K^+ Kanäle und werden deshalb auch „intermediate conductance Ca^{2+} activated K channels“ genannt (Hoffman *et al*., 2003). IK Kanäle kommen hauptsächlich, im Gegensatz zu anderen Ca^{2+} aktivierten K^+ Kanälen, in nicht-erregbaren Geweben vor (Joiner *et al.*, 1997; Ishii *et al.*, 1997). Der Öffnungsmechanismus von IK Kanälen ist spannungsunabhängig und wird allein durch einen Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration bestimmt. IK Kanäle, kodiert vom Gen KCNN4, gehören der KCNN Genfamilie an. Die Proteinsequenz von den IK Kanälen (früher als SK4 genannt) weist ca. 50 % Homologie zu den SK-Kanälen auf (Joiner *et al.*, 1997; Ishii *et al.*, 1997).

Die zuletzt entdeckte Gruppe der Ca^{2+} aktivierten K^+ Kanäle sind SK Kanäle. Sie wurden erstmals in kultivierten Skelettmuskelzellen von Ratten beschrieben (Blatz & Magleby, 1986).

Sie werden wie IK Kanäle ausschließlich durch Ca^{2+} aktiviert und sind nicht vom Membranpotential abhängig (Lancaster *et al.,* 1991). Die Blockierung der SK Kanäle durch Apamin, ein 18 Aminosäuren großes Peptid der europäischen Honigbiene (*Apis mellifera*), stellt eine Besonderheit dieser Kanäle dar. Sie besitzen mit 9-10 pS die kleinste Einzelkanalleitfähigkeit unter den Ca^{2+} aktivierten K^+ Kanäle und werden als „small conductance Ca^{2+} activated K^+ channels“ bezeichnet (Ishii *et al.*, 1997).

Wie oben schon erwähnt wurde, gehören SK Kanäle der *KCNN* Genfamilie an. *h*SK1,

*h*SK2 und *h*SK3 sind die 3 bis jetzt bekannten Mitglieder und werden durch die Gene *KCNN1*, *KCNN2*, und *KCNN3* kodiert (Chandy *et al.,* 1998).

1.1.2 Struktur des *h*SK3 Kanals

Der *h*SK3 Kanal besteht aus 4 α-Untereinheiten mit je 6 Transmembrandomänen (S1-S6) in jeder α-Untereinheit. Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung einer *h*SK3-α-Untereinheit.

Die 4 α-Untereinheiten bilden ein Tetramer. Zwischen dem 5. und 6. Transmembrandurchgang befindet sich der porenbildende Bereich (P).

Es besteht eine hohe Sequenzähnlichkeit innerhalb der transmembranären Segmente und der porenformenden Abschnitte der verschiedenen SK-Kanal-Proteine (80 – 90 % identisch), ihre zytosolisch gelegenen N- und C-terminalen Abschnitte unterscheiden sich allerdings deutlich in Sequenz und Länge (Xia *et al.*, 1998).

Der N-Terminus des *h*SK3 besitzt zwei glutaminreiche Domänen, auch Polyglutamin-Wiederholungen genannt. Die erste Glutaminwiederholung besteht aus 12 Glutaminen (CAG 12). Die zweite, dem C-Terminal gelegene, glutaminreiche Domäne ist hoch polymorph und wird CAG-variabel genannt. Die zwei Polyglutamin-Wiederholungen werden durch eine prolinreiche Region, die mehrere putative PXXP-Motive enthält, getrennt, wie in Abb. 1 gezeigt (Chandy *et al.,* 1998).

Der zytoplasmatische C-Terminus des *h*SK3, der sich direkt an die S6 Helix anschließt, verfügt über eine Calmodulin-Bindedomäne (CamBD), die ca. 90 Aminosäuren umfasst und die calciumabhängige Aktivierung des Kanals durch Calmodulin vermittelt (Xia *et al.*, 1998). Die Ca^{2+} unabhängige Interaktion von Calmodulin mit der Calmodulin-Bindedomäne wird von den 30 Aminosäuren, die zwischen den Aminosäurepositionen 421 und 440 im *h*SK3 Kanal liegen, vermittelt (Schumacher *et al*., 2001; Wissmann *et al.,* 2002).

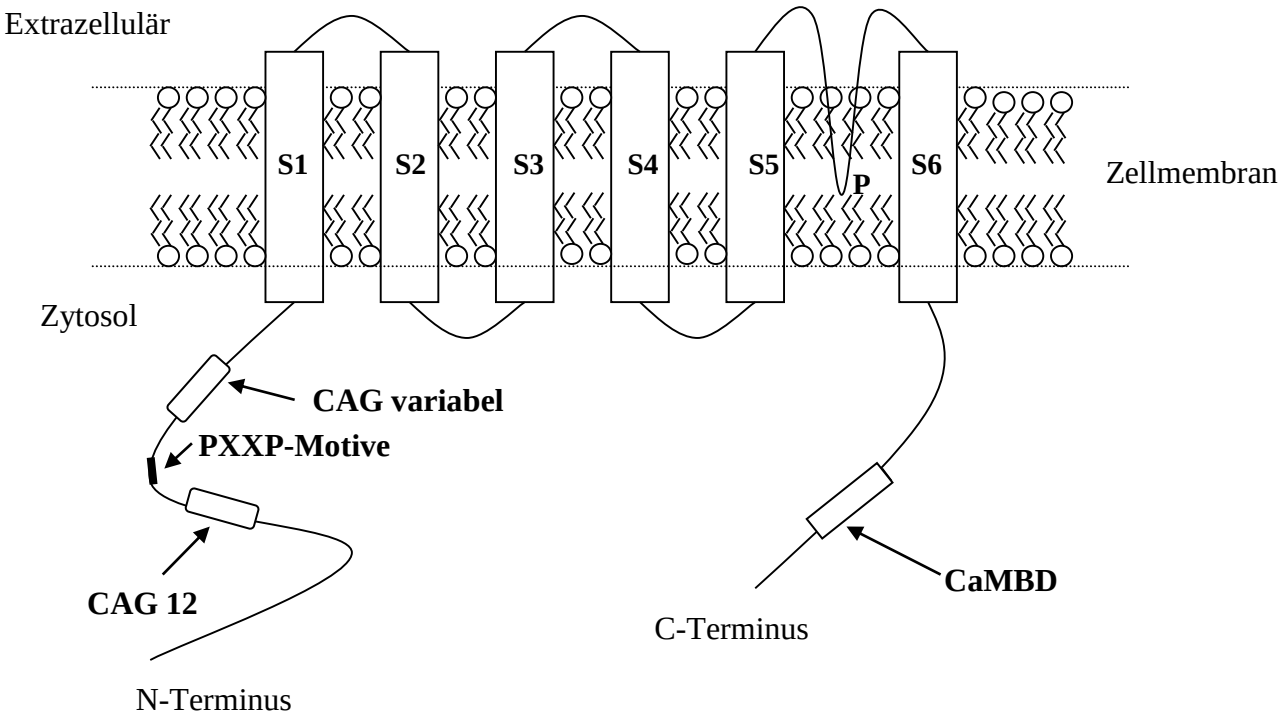


Abb. 1: Schematische Darstellung einer *h*SK3-α-Untereinheit

S1 – S6: transmembranäre Segmente; P: porenformende Region; CaMBD: Calmodulinbindedomäne; Im N-Terminus befinden sich die 2 Glutaminwiederholungen. Die erste Glutaminwiederholung besteht aus 12 Glutaminen (CAG 12), die zweite ist hoch polymorph(CAG variabel) und dazwischen eine prolinreiche Region, die PXXP-Motive: Aminosäuresequenz, N- und C-terminal von einem Prolin begrenzt, enthält.

1.1.3 Vorkommen des *h*SK3 Kanals

Der *h*SK3 Kanal kommt in verschiedenen Organen vor, hauptsächlich im Nervensystem, bevorzugt in der Substantia Nigra, aber auch in der Amygdala, dem Nucleus caudatus, dem Thalamus und dem Hippocampus, sowie im Tegmentum, dem Kleinhirn, der Hypophyse und dem Rückenmark (Lang und Ritchie, 1987; Park, 1994; Schlichter *et al.,* 2010). Außerdem wurde der Kanal auch in Lymphozyten, im Skelettmuskel, Myometrium und in der Herzmuskulatur sowie in Prostata, Nieren, Keimzellen, und im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen (Dror *et al.,* 1999; Stocker und Pedarzani, 2000; Tuteja *et al.,* 2010). Es liegen im Muskel von Patienten mit Myotoner Dystrophie (MD) Bindungsstellen für Apamin vor, die wahrscheinlich SK-Kanäle repräsentieren (Renaud *et al.*, 1986). In menschlichen leukämischen T-Lymphozyten sind auch *h*SK3 Kanäle nachgewiesen worden (Grissmer *et al.*, 1992; Jäger *et al.*, 2000).

1.1.4 Funktion des *h*SK3 Kanals

Die Aktivierung von *h*SK3 Kanälen wird über den zytoplasmatischen C-Terminus durch Ca^{2+} vermittelt. Dabei wird der *h*SK3 durch Calcium im mikromolaren Bereich, mittels des am C-Terminus gebundenen Calmodulin, aktiviert und spielt eine wichtige Rolle in der Präsynapse bei der Modulation der Erregung in vielen neuronalen Zelltypen, in denen sie zur langsamen Nachhyperpolarisation (afterhyperpolarization, AHP) beitragen. *h*SK3 Kanäle werden durch einen intrazellulären Ca^{2+}-Anstieg aktiviert, welcher über eine Konformationsänderung einen K^+-Efflux und somit eine Hyperpolarisation der Membran herbeiführen. Diese langsame Nachhyperpolarisation folgt Aktionspotentialen in erregbaren Zellen und begrenzt durch ihre Stärke und Dauer die Frequenz der Bildung von Aktionspotentialen (Wolfart *et al.*, 2001). Die AHP kann je nachdem also zur Erregbarkeit, Erregungsgeschwindigkeit, -frequenz und –art beitragen.

Wird der *h*SK3 Kanal durch Apamin, einem sehr spezifischen *h*SK3 Kanalblocker, blockiert, zeigte sich in den Neuronen durch die Blockierung der langsamen Nachhyperpolarisation eine entscheidende Veränderung deren Erregungsmuster (Hosseini *et al.,* 2001, Wolfart *et al.*, 2001).

In der Postsynapse verändern *h*SK3 Kanäle die Erregung im Nervensystem dadurch, dass *h*SK3 Kanäle mit NMDA-Rezeptoren in den dendritischen Dornfortsätzen von CA1 Neuronen kolokalisiert vorliegen (Ngo Anh *et al.*, 2005).

Während eines Endplattenpotentials passiert Ca^{2+} durch NMDA-Rezeptoren in die Zelle (Sabatini *et al*., 2002). Der intrazelluläre Ca^{2+}-Anstieg führt zu Aktivierung der *h*SK3 Kanäle. Dies führt wiederum zur Hyperpolarisation der Zellmembran. Die *h*SK3 Kanal vermittelte Hyperpolarisation führt folglich zur Inaktivierung des NMDA-Rezeptors, denn die Aktivität des NMDA-Rezeptors ist potentialabhängig und wird bei Potentialen nahe dem Ruhemembranpotential durch Mg^{2+} blockiert (Mayer *et al*., 1984).

Durch den soeben erwähnten negativen Feedback-Mechanismus zwischen *h*SK3 Kanälen und NMDA-Rezeptoren in CA1 Neuronen mit einer Veränderung der Langzeitpotenzierung (LTP) durch *h*SK3-Kanäle wurde eine physiologische Rolle dieser Kanäle für das altersabhängige Lernverhalten von Mäusen beschrieben

(Blank *et al.,* 2003). Bei der LTP handelt es sich um einen Vorgang, bei dem es zu einer lang anhaltenden Verbesserung der synaptischen Übertragung durch eine starke Aktivierung von afferenten Neuronen kommt. Für die verbesserte synaptische Übertragung ist ein erhöhter Ca^{2+} Einstrom, durch NMDA-Rezeptoren vermittelt, in die Postsynapse verantwortlich (Stackman *et al.,* 2002).

Eine Blockierung der *h*SK3 Kanäle durch Apamin führt somit zur Steigerung der für den hippokampalen Lernvorgang entscheidenden NMDA-Rezeptor Aktivität und somit zur gesteigerten Lernfähigkeit.

Der *h*SK3 konnte weiterhin in GnRH-sezernierenden Hypothalamusneuronen nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass 17β-Östradiol die Expression der SK3-mRNA erhöht (Bosch *et al.,* 2002) und daher der *h*SK3-Kanal möglicherweise bei der Hemmung der GnRH-Sekretion durch 17β-Östradiol im Menstruationszyklus eine wichtige physiologische Rolle spielt.

Der CAG Polymorphismus im N-Terminus und seine Funktion:

Zusätzlich zu der Funktion von *h*SK3 Kanälen insgesamt könnte der N-Terminus des SK3 Kanals durch eine strukturelle Eigenschaft möglicherweise eine besondere Funktion unter den SK Kanälen besitzen. Der N-Terminus des SK3 Kanals zeichnet sich durch zwei Glutaminwiederholungen aus, von denen eine hoch polymorph ist (Abb. 1).

Es wird vermutet, dass eine Verlängerung dieser zweiten CAG-Wiederholungssequenz mit Anorexia Nervosa (Koronyo-Hamaoui *et al.,* 2002, 2007), Migräne (Curtain *et al.,* 2005; Mossner *et al.,* 2005), Ataxie (Figueroa *et al.,* 2001) sowie Epilepsie (Sander *et al.,* 1999; Vijai *et al.,* 2005) in Zusammenhang stehen. Dieser Zusammenhang konnte bisher jedoch noch nicht endgültig nachgewiesen werden.

Während einige Studien einen Zusammenhang zwischen erblichen Schizophrenieerkrankungen sowie bipolaren affektiven Störungen und einer Verlängerung der polymorphen Glutaminwiederholungssequenz in *h*SK3 darstellten (Chandy *et al.,* 1998; Cardno *et al.,* 1999; Dror *et al.,* 1999), konnten wiederum andere Studien dieses Ergebnis nicht bestätigen (Li *et al.,* 1998; Antonarakis *et al.,* 1999; Bonnet-Brilhault *et al.,*1999; Ujike *et al.,* 2001; Grube *et al.,* 2011).

Die Tatsache, dass das *KCNN3*-Gen sich auf 1q21 befindet (Wittekindt *et al.*, 1998) und dass es eine Verbindung bestimmter Formen von erblicher Schizophrenie mit dem Genlocus 1q21-22 gibt (Brzustowicz *et al.*, 2000), lässt die Vermutung weiterhin

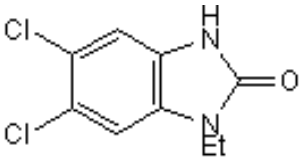
bestehen, dass *KCNN3* ein Kandidatengen für eine Form der erblichen Schizophrenie ist.
In einer jüngeren Studie wurde beobachtet, dass die Verlängerung der CAG-Wiederholungssequenz zu einer nachweisbaren Reduzierung der Leitfähigkeit des *h*SK3 Kanals und damit zu einer besseren kognitiven Leistung führt (Grube *et al.*, 2011).

1.2 *h*SK3 Kanalaktivierung durch DC-EBIO

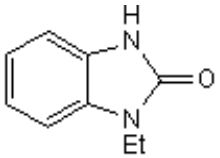
Da ich in meinen elektrophysiologischen Versuchen den *h*SK3 Aktivator DC-EBIO verwendet habe, möchte ich im folgenden Abschnitt einen Überblick über den Mechanismus dieses Aktivators geben.
*h*SK3 Kanäle werden durch Apamin, Skorpiontoxine wie das Tamapin oder das Scyllatoxin sowie durch organische Substanzen wie das UCL1648 blockiert (Wei *et al*., 2005).
Ihre Sensitivität gegenüber dem Aktivator 1-EBIO (1-Ethyl-2-benzimidazolinone) teilen sie mit IK Kanälen (Pedarzani *et al*., 2001). Bei 1-EBIO handelt es sich um eine Substanz, welche die Ca^{2+} Sensitivität von *h*SK3, vermutlich über eine Stabilisierung der Bindung zwischen Ca^{2+}-CaM und der *h*SK3 Kanal α-Untereinheit, erhöht und diese Erhöhung der Ca^{2+} Sensitivität des Kanals zu einer Steigerung der Kanalaktivität führt (Pedarzani *et al*., 2001).
Es wird angenommen, dass die 1-EBIO Sensitivität durch den C-Terminus von *h*SK3 Kanälen vermittelt wird (Pedarzani *et al*., 2001). Eine Veränderung bzw. Modulierung am C-Terminus könnte zu Veränderungen der Kanalaktivierung durch 1-EBIO führen. Es ist bekannt, dass der N-Terminus des *h*SK3 mit seinem C-Terminus interagiert (Frei *et al.,* 2006). Diese N-C Interaktion könnte deswegen die 1-EBIO Sensitivität durch eine Behinderung der 1-EBIO Bindungsstelle oder durch das Stören des 1-EBIO Aktivierungsmechanismus verändern (Singh *et al*., 2001). Frei *et al.* (2006) veröffentlichten Versuche, in denen die Aminosäuren 1-299 von SK3 (= SK3N_299) in PC12 Zellen exprimiert und elektrophysiologische Messungen durchgeführt wurden. In diesen Versuchen war die Sensitivität der endogenen *h*SK3 Kanäle gegenüber 1-EBIO durch die Expression der zusätzlichen Aminosäuren 1-299 von SK3 reduziert. Die Autoren schlossen, dass die transient exprimierten Aminosäuren

1-299 mit endogenen *h*SK3 Kanälen in PC12 Zellen über N-C-Interaktion interagierten und zu einer Veränderung der 1-EBIO Sensitivität führten (Frei *et a,* 2006).

In der vorliegenden Arbeit habe ich DC-EBIO (5,6-dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro 2*H*-benzimidazol-2-one) aufgrund seiner stärkeren Wirkung in den Patch-Clamp-Messungen verwendet. Unter den verschiedenen Benzimidazolon-Derivaten hat DC-EBIO die potenteste Wirkung auf Ca^{2+}-aktivierte Kaliumkanäle. Wie in Abbildung 2 dargestellt, zeigte DC-EBIO eine 100-fach bessere Aktivität, im Vergleich zu 1-EBIO, an *h*IK1 Kanälen in Patch-Clamp-Messungen (Devor *et al*., 1996).



DC-EBIO



1-EBIO

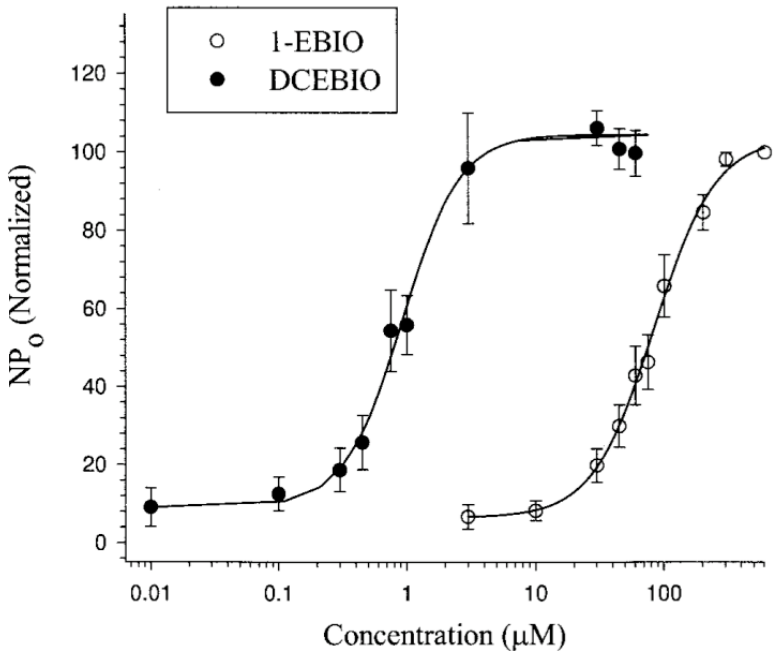


Abb. 2: Die Sensitivität von DC-EBIO vs. 1-EBIO (Devor *et al.,* 1996):

Konzentrationsabhängige Veränderung der Kanalaktivität in *h*IK1 Kanälen durch 1-EBIO bzw. DC-EBIO. NP_o ist das Produkt von Einzelkanalamplitude (N) und die Offenwahrscheinlichkeit (P_o). DC-EBIO (5,6-dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro 2*H*-benzimidazol-2-one) zeigte eine 100-fach bessere Wirkung als 1-EBIO (1-Ethyl-2-benzimidazolinone) auf den *h*IK1 Kanal. (Devor *et al.,* 1996).

1.3 Endophilin 3

Die Interaktion zwischen dem Ca^{2+}-aktivierten Kaliumkanal *h*SK3 und dem Endophilin 3 zu untersuchen, basiert auf der Tatsache, dass der N-terminale zytosolische Anteil des *h*SK3-Proteins große strukturelle Ähnlichkeit mit dem Protein Huntingtin aufweist, denn von Huntingtin ist bekannt, dass es über die prolinreiche Region mit dem Endophilin 3 via seine SH3-Domäne interagiert (Sittler *et al.,* 1998). Endophilin 3 interagiert umso stärker mit Huntingtin, je länger die pathologisch veränderte aminoterminale Glutaminregion ist. So hat ein Huntingtin-Protein mit einer Polyglutaminsequenzlänge im pathologischen Bereich eine fünffach höhere Affinität zu Endophilin 3 als ein Huntingtin mit normaler Polyglutaminsequenzlänge. Diese CAG-Wiederholungen, im ersten Exon des Huntingtin-Gens gelegen, haben bei gesunden Personen eine Länge von 6 – 39 Wiederholungen, während bei Huntington-Krankheit-Patienten zwischen 36 – 180 Wiederholungen üblich sind (Sathasivam *et al.*, 1997). Man geht davon aus, dass die Huntingtin-Endophilin3-Wechselwirkung eine Rolle in der Progression von Chorea Huntington besitzt, da es die Formation von Aggregaten aus mutiertem Huntingtin verstärkt (Sittler *et al.,* 1998).

In Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen lies sich zeigen, dass Endophilin 3 auch mit den N-terminalen 299 Aminosäuren des Ca^{2+}-aktivierten Kaliumkanals *h*SK3 interagiert (Spindler *et al.,* 2003). Da in meiner Arbeit der in Hefe nachgewiesen Interaktion elektrophysiologisch nachgegangen werden soll, werde ich im folgenden Abschnitt der Einleitung einen Einblick in Endophilin 3 und seine Funktion geben.

1.3.1 Familie und Struktur

Endophiline sind zytoplasmatische Proteine mit der Gemeinsamkeit, dass sie alle eine SH3-Domäne, eine coiled-coil-Region und eine BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs-homology)-Domäne besitzen (Abb. 3). Die Endophiline liegen als Dimere vor. Die Homo- und Heterodimerisierung der Endophiline wird über die coiled-coil- Region realisiert (Ringstad *et al*., 2001). Die SH3-Domänen sind schon seit einiger Zeit als Interaktionspartnern von prolinreichen Regionen bekannt. Die BAR-Domäne bindet

Fettsäuren und besitzt bei bestimmten Endophilinen eine Lysophophatidsäure-Acyl-Transferase-Aktivität-(LPAAT)-Domäne (Schmidt *et al.,* 1999). Zu den BAR-Domänen-Proteinen gehören 6 Familien, wobei die Endophiline A1 (SH3GL2), A2 (SH3GL1), A3 (SH3GL3) und B zusammen mit Nadrin und SH-BP1 eine Unterfamilie bilden (Habermann, 2004).

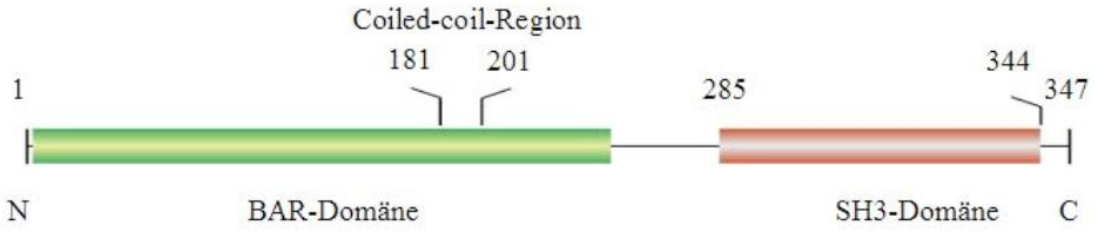


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Endophilin 3-Monomers.

Da die Proteine der Endophilin-Familie fast zeitgleich von mehreren unabhängigen Forschungsgruppen publiziert wurden, hat sich bis heute keine der verschiedenen Bezeichnungen durchgesetzt. In Tabelle 1 sind die verschiedenen Bezeichnungen kurz zusammengefasst.

Name	***Accessionnummer***	***Alternativnamen***
Endophilin A1	NM_003026	SH3GL2, Endophilin I, SH3p4
Endophilin A2	NM_003025	SH3GL1, Endophilin II, SH3p8, EEN
Endophilin A3	X99664	SH3GL3, Endophilin III, SH3p13
Endophilin B	AF263293	
Nadrin	NM_018054	
SH3-BP1	NM_018957	

Tab. 1: Bezeichnungen der Endophiline und Accessionnummern:

Aus Einfachheitsgründen verwendete ich in der vorliegenden Arbeit die Bezeichnung Endophilin 3 statt Endophilin III.

Betrachtet man die Sequenzen der Mitglieder dieser Endophilin-Familie, wie in Abbildung 4, so zeigt sich die größte Ähnlichkeit zwischen Endophilin 3 und Endophilin 1.

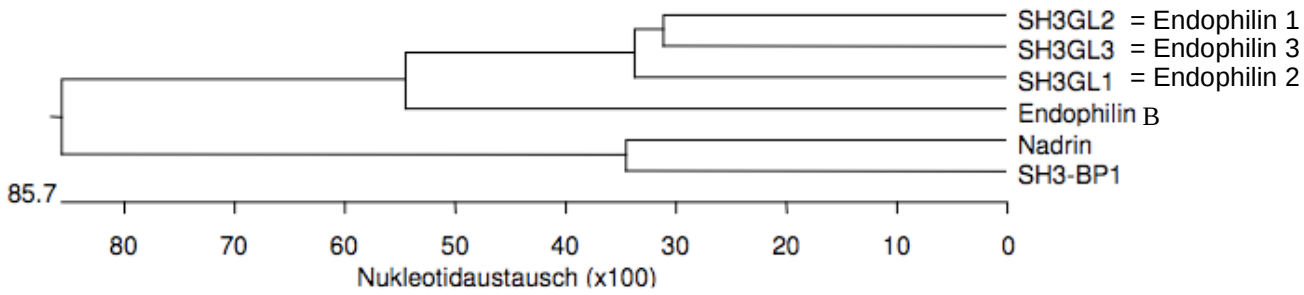


Abb. 4: Phylogenetischer Baum der Endophilin-Familie (Habermann, 2004).

1.3.2 Vorkommen und Funktion

Untersuchungen zu den Expressionsmustern der humanen Endophilin-Isoformen zeigten eine hirnspezifische Expression für Endophilin 1 (SH3GL2), eine ubiquitäre Gewebeverteilung für Endophilin 2 (SH3GL1) und eine auf Hirn und Testis begrenzte Expression von Endophilin 3 (SH3GL3) (Giachino *et al*., 1997).

Die geläufigste Bezeichnung als Endophilin bezieht sich auf Interaktionen von Endophilin 1 mit verschiedenen endozytotischen Proteinen und seine zentrale Rolle bei der Endozytose von synaptischen Vesikeln (Micheva *et al.*, 1997).

Die Endophiline binden Dynamin und Synaptojanin über ihre SH3-Domäne. Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Endozytose (Ringstad *et al*., 1997). Es wird angenommen, dass Endophilin 1 bei der Endozytose die Membrankurvatur verändert und so zur Abschnürung der Vesikel beiträgt. Darüber hinaus konnte auch die Beteiligung von Endophilin 1 bei der Vesikel-Reifung gezeigt werden. Durch Mikroinjektion von Endophilin-Antikörpern konnte ein frühes Stadium des endozytotischen Prozesses gehemmt werden (Ringstad *et al*., 1999).

Endophilin 1 ist notwendig beim Übergang der frühen zu den späten Stadien der Clathrin-vermittelten Endozytose synaptischer Vesikel (Ringstad et al.,1999).

Durch die LPAAT-Domäne verfügt Endophilin 1 über eine Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase-Aktivität, wodurch es die Synthese von Phosphatidsäure aus Lysophosphatidsäure und Acyl-CoenzymA katalysiert und damit die Wölbung der Lipiddoppelschicht beeinflußt (Schmidt *et al*., 1999).

Während der Endozytose ist bei der Abschnürung der endozytotischen Vesikel eine Veränderung der Membrankurvatur notwendig, bei der in diesem Modell das Verhältnis von Lysophosphatidsäure zu Phosphatidsäure zugunsten der Phosphatidsäure verschoben wird. Dies soll im Bereich des „Halses“ der

endozytotischen Vesikel durch eine Umstülpung der konkaven in eine konvexe Kurvatur der Zellmembran ermöglicht werden.

Nicht alle Endophiline verfügen über die LPAAT und diese ist demzufolge keine essentielle Funktion der Endophiline (Modregger *et al*., 2003). Endophilin 3 besitzt keine Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase-Aktivität und verringert die Rezeptor-vermittelte Endozytose von D_2-Rezeptoren (Sugiura *et al.*, 2004). Dies wird auf eine β-Faltblattanordnung der Aminosäuren 261-265 in Endophilin 3 zurückgeführt. (Schmidt *et al.*, 1999; Scales und Scheller, 1999; Übersicht bei Huttner *et al.,* 2000).

Des Weiteren wird vermutet, dass Dimere der BAR-Domänen von Endophilinen an die Lipiddoppelschicht binden, sich mit je einem N-terminalen amphipathischen Fortsatz beider Monomere und mit einer amphipathischen „Kante“ in die Membran integrieren und damit den Beugungswiderstand der Membran durch elektrostatische Kräfte zwischen den Phosphatresten der Lipide und positiv geladenen Aminosäureseitenketten des starren BAR-Domänengerüsts überwinden und so die Membran konkav (nach innen gestülpt) verformen (McMahon *et al.*, 2005; Masuda *et al.*, 2006, Gallop *et al.*, 2006).

Wird jedoch die C-terminale SH3-Domäne durch Mikroinjektion von prolinreichen Peptiden blockiert, können sowohl tief invaginierte als auch clathrinumhüllte Vesikel beobachtet werden (Gad *et al*., 2000). Des Weiteren konnte auch die Vesikel-Abschnürung durch die Mikroinjektion der SH3-Domäne von Endophilin blockiert werden, wobei sich Intermediate (unvollständige Vesikeln) mit verlängerten Vesikelhälsen bildeten, die von Dynaminringen umgeben waren (Simpson *et al*., 1999).

So können Endophiline durch ihre SH3-Domäne mit verschiedenen Proteinen interagieren und eine zentrale Rolle bei der Endozytose spielen, indem die Membrankurvatur durch diese Interaktion verändert wird und zur Abschnürung der Vesikel beiträgt (Ringstad *et al*., 1997). Endophiline spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Clathrin-vermittelten Endozytose synaptischer Vesikel (Ringstad et al., 1999). Auch die Dimere der BAR-Domänen von Endophilinen beteiligen sich bei der Verformung der Membran während der Endozytose (McMahon *et al.*, 2005).

Die Interaktion von Endophilin 3 mit dem *h*SK3 Kanal kann somit eine wichtige Rolle bei der Endozytose des *h*SK3 Kanals spielen.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Vorarbeiten zu der vorliegenden Arbeit zeigten, dass eine Interaktion zwischen dem Ca^{2+}-aktivierten Kaliumkanal *h*SK3 und dem Endophilin stattfindet (Spindler *et al.,* 2003; Hoppner *et al.,* 2004). Diese Interaktion konnte im Rahmen der Promotionsarbeit von Frau Spindler in Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen nachgewiesen werden. Herr Hoppner zeigte in seiner Arbeit, dass Endophilin 3 biochemisch *in vitro* mittels Pull-Down-Assay mit den N-terminalen 299 Aminosäuren des Ca^{2+}-aktivierten Kaliumkanals *h*SK3 interagiert. Da die Interaktion bisher nicht in Säugerzellen nachgewiesen wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die Interaktion sich auch in Säugerzellen nachweisen lässt.

Dazu sollten mittels elektrophysiologischer Untersuchungen folgende Fragen bearbeitet werden:

1. Findet die Interaktion von Endophilin 3 mit dem *h*SK3 Kanal auch in Säugerzellen statt?
2. Hat die Interaktion von Endophilin 3 mit dem *h*SK3 eine physiologisch nachweisbare Bedeutung, zum Beispiel durch Veränderung der Kanalaktivierung?
3. Moduliert die Interaktion von Endophilin 3 mit dem *h*SK3 die pharmakologischen Eigenschaften des Kanals?
4. Wird die Kanalexpression in der Membran durch die Interaktion von Endophilin 3 mit dem *h*SK3 beeinflusst?

2. Material und Methoden

2.1 Molekularbiologie

2.1.1 Lösungen und Reagenzien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Invitrogen Ltd. (Paisley, Schottland, UK) und Carl Roth GmbH + Co-KG (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Um bakterielle Flüssigkulturen herzustellen, wurde LB Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; ad pH 7,2 mit 5 M NaOH) eingesetzt. Zur Herstellung fester Nährböden (LB Agarplatten) wurde die Flüssigkultur mit 20 g/l Agar versetzt. Unmittelbar nach der Herstellung der Medien erfolgte die Sterilisation für 20 min bei einer Temperatur von 120°C und einem Druck von 1,2 bar im Dampfdruckautoklaven von der Firma Bioscience GmbH (Dreieich, Deutschland). Für selektives Wachstum wurden die Medien nach der Sterlisation, bei einer Temperatur von etwa 60°C, auf eine Endkonzentration von 100 mg/l Ampicillin (LB^{+Amp}) eingestellt. Die hierfür eingesetzte, sterilfiltrierte Stocklösung beinhaltete 100 g/l Ampicillin-Na in einer 50% (v/v) Ethanol/H_2O Lösung und wurde bei -20°C gelagert. Als Vollmedium für die Transformation wurde 2YT Medium (5 g/l NaCl, 16 g/l Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, ad pH 7,0 mit 5 M NaOH) verwendet.

2.1.2 DNA-Klone und Bakterienstämme

Das PTL1-HA-SH3GL3 Wildtyp Plasmid wurde mir freundlicherweise von Dr. Sittler vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik (Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Der PTL1-1-HA-SH3GL3 trägt ein HA-Epitop am 5'Ende des SH3GL3. Der PTL1 ist ein Derivat des Vektors pSG5, der einen SV40 frühen Promotor für *in vivo* Proteinexpression und einen T7 Promotor für die *in vitro* Expression sowie ein Gen für die Resistenz gegen Ampicillin trägt.

Für die Transformation von DNA-Plasmiden in Bakterien wurde der *Escherichia* coli *(E. coli)*-Bakterienstamm XL-1 Blue (**Gentoyp:** recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB, $lacI^qZ\Delta M15$, Tn10 (Tet^r)]) eingesetzt (Bullock *et al*., 1987).

3.1.3. Transformation

Die für spätere Transfektionen verwendeten Plasmide wurden mittels Transformation in kompetente E. coli-Bakterien Stamm XL-1 Blue eingebracht und dort im Vermehrungszyklus vervielfältigt. Dabei kam die $CaCl_2$-Methode (Mandel & Higa, 1970; Cohen *et al.*, 1972) für die Herstellung kompetenter Bakterien sowie für die Transformation zur Verwendung.

Nachdem eine Übernachtkultur von den Bakterien in LB-Medium auf eine OD_{600} von etwa 0,1 verdünnt wurde, wurde die Kultur bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD_{600} von etwa 0,5 kultiviert. Im Anschluss erfolgte die erste 10-minütige Zentrifugation von der Kultur bei 1000 g und 4° C. In der Hälfte des Ausgangsvolumens der $CaCl_2$-Lösung wurde das Pellet aufgenommen. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die zweite Zentrifugation und das Pellet wurde in 1/10 des Ausgangsvolumens aufgenommen. Die Zellen wurden danach für die Dauer von 1 h - 24 h bei 4°C inkubiert (Sambrook *et al.*, 1989).

Die kompetenten Zellen wurden mit 15 % Glycerin versetzt und bei –80°C eingefroren oder direkt transformiert.

Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen (Zelldichte = ~1 * 10^8 / ml) pro Ansatz eingesetzt. Zu den kompetenten Zellen wurde max. 5 µl Plasmid-DNA mit der Konzentration von 0,8µg/µl gegeben. Nach einer 20-30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock (45 s bei 42°C) im Wasserbad. Nach einer Zugabe von 0,5 ml 2YT Medium pro Ansatz wurden die Zellen 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

Die Bakterien wurden nach der Transformation auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Bei Transformationen mit ampicilinresistenten Plasmiden wurden die transformierten Bakterien auf LB Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicilin ausplattiert.

3.1.4. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid DNA erfolgte nach Standardmethoden. Dabei wurde die Hauptkultur mit Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium und 100 µg/ml Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C mit 180 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte die Isolierung der Plasmid DNA mit dem Quiagen Plasmid Midi Kit bzw. mittels des GFX ™ Micro Plasmid Kits (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala,

Schweden) nach der Vorgabe des Herstellers.

2.1.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Für die Durchführung der Transfektion in Zellen sowie für die Transformation in Bakterien musste die Konzentration der verwendeten DNA bestimmt werden. Die Bestimmung erfolgte photometrisch. Hierzu wurde 1 µl der zu bestimmenden DNA-Lösung mit 99 µl Wasser verdünnt und die Extinktion der verdünnten DNA-Lösung in einem Photometer gegen Wasser bei 260 nm Wellenlänge bestimmt.
Eine optische Dichte von 1,0 bei 260 nm (OD_{260}) entsprach dabei ca. 50 µg Plasmid-DNA pro ml (Sambrook *et al.*, 1989). Zusätzlich wurde die DNA durch Gelelektrophorese aufgetrennt und die Länge in einem UV-Transilluminator durch Vergleich mit einem ebenfalls aufgetragenen Längenstandard bestimmt.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Lösungen und Reagenzien

Die elektrophysiologischen Versuche wurden an endogen exprimierten SK3 Kanälen in PC12 Zellen, Phäochromocytom-Zelllinie der Ratte (Greene und Tischler, 1976) durchgeführt. Die PC12 Zellen wurden in Minimum Essential Medium mit Earles Salzen (MEM+Glutamax, Invitrogen Ltd, Paisley, Scotland, UK, Kat.-Nr. 41090-028) angereichert mit 10% FCS (Fötales Kälberserum) und einem Anteil von 5% HS (Pferdeserum) bei 37°C unter 5 Vol. % CO_2 in einem luftbefeuchteten Inkubator kultiviert.

2.2.2 Kultivierung der PC12 Zellen

Die PC12 Zelllinie, erworben von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland), wurde in einem luftbefeuchteten Inkubator bei 37°C unter 5 Vol. % CO_2 kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 bis 1:5 gesplittet. Das Kulturmedium wurde dabei unter sterilen Bedingungen abgesaugt und die Zellen mit ca. 5 ml frischem Medium

durch kräftiges Spülen abgelöst und in neues Kulturmedium überführt.

2.2.3 Transfektion mit Plasmid-DNA

Die Transfektion von PC12 Zellen wurde mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) durchgeführt. Die Zellen wurden mit der Endophilin 3 Plasmid-DNA sowie mit einem Vektor, der das Green Fluorescent Protein (GFP) kodiert (pEGFP-N1 Clontech, Palo Alto, Kalifornien, USA) kotransfiziert. Die Kotransfektion mit dem GFP diente zur Identifikation der transfizierten Zellen. Für die Kontrollversuche wurden die PC12 Zellen nur mit GFP transfiziert. Ein Tag vor der Transfektion wurden etwa 500 µl Zellen während des Splittens in 24-Well-Platten überführt. Die Transfektion erfolgte, wenn 90-95% der Zellen konfluent waren. Die Transfektion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: In einem Ansatz wurden 2 µl Lipofectamine ™ 2000 Reagenz auf 50 µl Medium ohne Serum zugegeben. In dem zweiten Ansatz wurden 0.8 µg Plasmid DNA und 0.1 µg GFP Plasmid DNA auf 50 µl Medium ohne Serum zugegeben, gemischt und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Danach wurden die 2 Ansätze zusammengefügt und erneuert 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von dem Reagenzgemisch auf die Zellen in den 24-Well-Platten. Das Medium wurde nach 4-6 Stunden abgesaugt und mit 1.5 ml frischem Kulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden 1-3 Tage bei 37°C unter 5 Vol. % CO_2 inkubiert.

2.2.4 Vorbereitung der Zellen für die elektrophysiologischen Messungen

Für die elektrophysiologischen Experimente wurde das alte Kulturmedium aus den Kulturschälchen abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit 2 ml neuem Kulturmedium gewaschen und auf die Messkammer überführt. Als Messkammer diente ein Teflonring (O-Ring N.DIN PTFE, THF GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland), der mit Zweikomponentensilikon (SYLGARD 186, Dow Corning, Inc, Midland, USA) auf Deckgläschen (24x24 mm, Stärke 0,13-0,16 mm, VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland) geklebt und anschließend bei 200°C gehärtet und

autoklaviert wurde.

2.3 Elektrophysiologie

3.3.1 Lösungen und Reagenzen

Die in Tabelle 2 aufgelisteten Lösungen wurden als externe Badlösungen eingestzt. Die Lösungen wurden mit einer einmolaren Lösung des jeweiligen Hydroxids auf pH 7,4 eingestellt.

Tab. 2: Zusammensetzung der extrazellulären Badlösungen (mM). Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

	K^+-Aspartat	Na^+-Aspartat	Cs^+-Aspartat	$CaCl_2$	$MgCl_2$	HEPES
Na^+-Lösung	4,5	160	-	2	1	5
K^+-Lösung	164,5	-	-	2	1	5
Cs^+-Lösung	-	-	165	2	1	5

Die intrazelluläre Lösung für die Experimente enthielt (mM): 135 K^+- Aspartat, 2 $MgCl_2$, 10 HEPES, 10 K_2EGTA, und 8.422 $CaCl_2$. Dies entsprach einer freien Ca^{2+}-Konzentration von 1 µM (Portzehl *et al*., 1964). Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7.2 eingestellt.

Die Osmolarität der extrazellulären Badlösung sowie die der intrazellulären Pipettenlösung lag bei 290-320 mosM.

Das DC-EBIO (5,6-dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro 2*H*-benzimidazol-2-one) wurde von der Firma Tocris Bioscience (Ellisville, USA) bezogen. Die Substanz wurde in 3, 30 und 100 mM Stocklösung in DMSO gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Für die

Messungen in verschiedenen Konzentrationen wurden mit diesen Stammlösungen 3, 10, 30, 100 und 300 µM DC-EBIO Lösungen in Cs^+-Lösung angesetzt. Der DMSO-Anteil in der extrazellulären Badlösung betrug dabei max. 3%.

3.3.2 Aufbau der Patch-Clamp-Apparatur

Mittels der Patch-clamp-Technik lassen sich elektrische Eigenschaften von einzelnen Zellen oder bestimmten Zellarealen bestimmen (Neher, 1978; Cahalan, 1992).

Der Messplatz setzt sich zusammen aus einem inversen Mikroskop, dem Axiovert 100 (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland), das auf einem zur Vibrationsdämpfung pressluftgefederten Tisch (Newport Corporation, Irvine, USA) installiert war. Die Fluoreszenzeinheit des Mikroskops diente zur Identifizierung der mit GFP transfizierten Zellen.
Ein EPC-9 Patch-clamp-Verstärker (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht, Deutschland), angeschlossen an einen PC, ermöglichte die Induktion sowie die Aufnahme der Ströme von Ganzzellableitungen. Mit Hilfe der Software *Patchmaster v2.0* (HEKA, Elektronik GmbH) wurde der Verstärker gesteuert und die Messdaten konnten aufgenommen und gespeichert werden.
Die Badelektrode, aus einem chlorierten Silberdraht, war über eine Agarbrücke mit der Badlösung verbunden. Mit dem anderen Ende war sie an dem Verstärker des Messkopfes angeschlossen. Die Messelektrode, ebenfalls aus einem chlorierten Silberdraht, war in einer Glaskapillare von Pipettenlösung umgeben. Die Glaspipetten aus Borosilikatkapillaren (GB 150-TF10) wurden von der Firma Science Products GmbH bezogen (Hofheim, Deutschland) und erst am Versuchstag mit Hilfe eines DMZ- Universal-Pullers (Zeitz, München, Deutschland) in drei Stufen ausgezogen. Gleich danach wurden die Pipetten mit einem glühenden Draht an einer Microforge (Eigenbau der Abteilung) feuerpoliert. Nach Befüllen der Pipette mit Pipettenlösung lag der elektrische Widerstand an der Pipettenspitze immer im Bereich von 2-4 MΩ.

3.3.3 Versuchsdurchführung

Ziel der Patch-clamp-Technik ist es, Aufschluss über die in der Zellmembran vorhandenen Ionenkanäle zu gewinnen.

Durch Eintauchen der Pipette in die Badlösung der Messkammer, wurde ein Strom, proportional zum Widerstand der Meßpipette gemessen, der vom *Patchmaster*-Programm (HEKA elektronik, Lambrecht, Deutschland) über den Verstärker EPC-9 (HEKA elektronik, Lambrecht, Deutschland) appliziert wurde. Nach Abgleichen des *Offset*-Potentials wurde die Pipette mit Hilfe eines Mikromanipulators in unmittelbare Nähe der Zellmembran gebracht und durch das Erzeugen von leichtem Unterdruck in der Pipette wurde die Zellmembran so an die Glaspipette gezogen, dass ein Giga-*Seal* erzeugt wurde. Damit befand sich die Zelle im cell-attached Modus. Wurde der Unterdruck weiter verstärkt, so riss die Zellmembran ein und es bestand eine Verbindung zwischen der Pipettenlösung und dem Zytoplasma der Zelle. Dieser Zustand wird als whole-cell-Konfiguration bezeichnet. In diesem Modus konnten die Ströme aller Kanäle dieser Zelle gemessen werden. Nach Erreichen des whole-cell-Modus konnten mit Hilfe des *Patchmaster*-Programms (HEKA elektronik, Lambrecht, Deutschland) die entsprechenden Messparameter an der Zelle über den Verstärker gesteuert werden.

Das Membranpotential wurde mit 200 ms dauernden Spannungsrampen von –120 bis +60 mV kontinuierlich erhöht. Zwischen den einzelnen Rampen wurde das Potential für 10 s auf –80 mV gehalten. Dieses Protokoll dient dem schnellen Einschätzen der verschiedenen Komponenten der Membranleitfähigkeit. Das Haltepotential betrug bei allen Messungen -80 mV.

Durch manuelle Perfusion erfolgte der Austausch der extrazelluläre Lösung in der Messkammer innerhalb von 30 s. Dabei wurde überschüssige Lösung oberhalb der Messkammer automatisch abgesaugt.

3.3.4 Auswertung der Daten

Die Auswertung der Daten wurde mit Hilfe der Programme *Fitmaster v2.15* (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht, Deutschland), *Igor Pro 3.1.2* (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, Oregon, USA) und *Microsoft® Office Excel 2007* (Microsoft Corporation, Seattle, USA) durchgeführt.
Daten sind als Mittelwert ± Standartabweichung angegeben.
Der DC-EBIO-sensitive-Strom wurde nach der folgenden Gleichung bestimmt. Dabei wurde der Strom in der DC-EBIO-freien Cs^+-Lösung abgezogen:

$$P = (I_{DC\text{-}EBIO(x)} - I_{DC\text{-}EBIO(0)}) / (I_{DC\text{-}EBIO(300)} - I_{DC\text{-}EBIO(0)})$$

$I_{DC\text{-}EBIO(x)}$ ist der Strom bei einer bestimmten DC-EBIO Konzentration. $I_{DC\text{-}EBIO(0)}$ ist der Strom in der DC-EBIO freien Lösung (Konzentration 0) und $I_{DC\text{-}EBIO(300)}$ der Strom bei maximaler DC-EBIO Konzentration, hier 300 µM.

Dosis-Wirkungskurve: EC_{50} wurde durch das Anpassen einer modifizierten Hill Funktion (Gleichung) an die Werte der Dosis-Wirkungskurve bestimmt.

$$\textit{DC-EBIO-sensitiver-Strom} = 1/(1 + (EC_{50} / [\text{DC-EBIO}]))$$

wobei EC_{50} die DC-EBIO Konzentration ist, bei der die Hälfte aller *h*SK3 Kanäle aktiviert sind. Der Hill Koeffizient ist gleich 1. [DC-EBIO] beschreibt die DC-EBIO-Konzentration in der extrazellulären Badlösung.

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die in Hefe nachgewiesene Interaktion zwischen dem Ca^{2+}-aktivierten Kaliumkanal *h*SK3 und dem Endophilin 3 auch in Säugerzellen vorkommt und damit möglicherweise eine physiologische Bedeutung hat. In Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen konnte nämlich eine Interaktion zwischen dem N-Terminus des *h*SK3 und dem Endophilin 3 gezeigt werden (Spindler *et al.,* 2003) und eine weitere Promotionsarbeit befasste sich damit, die Interaktion von Endophilin 3 mit dem *h*SK3-Kanal direkt biochemisch nachzuweisen. Dabei wurde die polyHis-Pull-Down-Assay-Methode zum Einsatz gebracht (Hoppner *et al.,* 2005).

Da die Interaktion bisher nicht in Säugerzellen nachgewiesen wurde, war es jetzt meine Aufgabe zu untersuchen, ob die Interaktion sich auch in Säugerzellen nachweisen lässt. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, transfizierte ich PC12 Zellen, die endogen *h*SK3 Kanäle besitzen, mit Endophilin 3 und maß anschließend Ganzzellströme endogener *h*SK3 Kanäle mithilfe der *patch-clamp*-Technik.

Um einen nachweisbaren Effekt auf die Interaktion von Endophilin 3 mit dem *h*SK3-Kanal zurückzuführen und genauer zu charakterisieren führte ich parallel, unter den gleichen Bedingungen, Kontrollversuche durch. Die Kontrollversuche sollten dazu dienen, die äußeren Effekte und Bedingungen, die möglicherweise durch den Versuchsvorgang entstehen, zu erfassen. Zu den äußeren Effekten gehört u.a. die Transfektion bzw. die Expression eines Proteins in den PC12 Zellen. Um auszuschließen, ob bereits die Expression eines zusätzlichen Proteins einen unspezifischen Effekt auf die Expression endogener SK3 Kanäle besitzt, transfizierte ich für Kontrollversuche PC12 Zellen mit pEGFP-N1 (pEGFP-N1 gewährleistet die Expression von GFP). Es ist bekannt, dass die Expression von GFP sich gut eignet, um eine transfizierte Zelle zu identifizieren. Die Identifizierung der mit GFP transfizierten Zellen erfolgte mit der Fluoreszenzeinheit des Mikroskops.

Um den Einfluss des Transfektionsprozesses auf die *h*SK3 Kanalexpression zu evaluieren, wurde ein Teil der PC12 Zellen mit GFP, für die Kontrollversuche, transfiziert und gleichzeitig parallel dazu der andere Teil mit Endophilin 3 + GFP transfiziert. Die Inkubationsdauer wurde dementsprechend sowohl für die Kontrollversuche als auch für Endophilin 3 Versuche gleich gehalten.

3.1 Endogene Ströme durch *h*SK3 Kanäle in PC12 Zellen in Kontrollexperimenten.

Nachdem die PC12 Zellen mit GFP transfiziert wurden, wurden Ganzzellströme mit Hilfe der *patch-clamp*-Technik gemessen. Die *h*SK3 Kanäle befanden sich zu Beginn der Messungen in Na^+-Lösung als extrazelluläre Lösung. Endogene Ströme durch *h*SK3 Kanäle wurden mit 1 µM freiem Ca^{2+} in der Pipette als intrazelluläre Lösung aktiviert. Das Membranpotential wurde von -120 mV bis +60 mV innerhalb von 200 ms verändert und die Ströme gemessen. Abbildung 1 stellt einen repräsentativen Kontrollversuch dar. Bei Betrachtung des Stromverlaufs in Na^+-Lösung (rot), sieht man von -120 bis ca. -60 mV einen minimalen Einstrom mit einer Stromamplitude von ca. -27 pA bei -80 mV. Wie in dem Teil Material und Methode beschrieben enthält die extrazelluläre Na^+-Lösung 4,5 mM K^+. Somit liegt das Umkehrpotential für K^+ in Na^+-Lösung bei ca. -80 mV nach der Nerst-Gleichung. Bei diesem Potential sind die Ionenflüsse von Kalium im Gleichgewicht. Das heißt, durch die *h*SK3 Kanäle findet kein Nettostromfluss von Kalium statt. Somit stellen die Stromamplituden in Na^+-Lösung bei – 80 mV den Leckstrom dar. Es wurden 20 Zellen mit der Kontrolle transfiziert (GFP) und im Anschluss gemessen. Der Mittelwert des Nettostroms in Na^+-Lösung bei -80 mV betrug -15,5 pA mit einer Standartabweichung von 6,8 pA.

Da *h*SK3 Kanäle Ca^{2+}-aktivierte Kaliumkanäle sind, führte ich ein paar Messungen in K-Lösung als extrazelluläre Badlösung durch. Beim Austausch von extrazellulärer Na^+-Lösung gegen K^+-Lösung nahm die Einwärtsstromamplitude von -120 mV bis 0 mV deutlich zu. Bei 0 mV war kein Strom zu messen und bei positiveren Potentialen war ein Auswärtsstrom zu beobachten. Das Umkehrpotential verschob sich somit auf ungefähr 0 mV. Bei – 80 mV betrug die Stromamplitude ungefähr -357 pA. Die Verschiebung des Umkehrpotentials und der einwärts gerichtete Strom bei Potentialen negativer als 0 mV unterstützen die Annahme, dass es sich bei dem gemessenen Strom um einen Kalium-Strom handelt. Es war allerdings unklar ob dieser Strom nur durch *h*SK3 Kanäle fließt oder ob andere Kaliumkanäle in PC12 Zellen auch zu dem Strom beitragen. Falls PC12 Zellen z.B. Kir Kanäle besitzen würden, würde das die Charakterisierung von endogenen *h*SK3 Kanälen in der K-Lösung erschweren, denn die Stromamplitude in K-Lösung könnte Ströme durch Kir Kanäle beinhalten. Um möglichst nur Ströme durch *h*SK3 Kanäle zu messen, habe ich in allen weiteren Messungen als extrazelluläre Lösung eine Cs^+-Lösung benutzt,

weil *h*SK3 Kanäle einen signifikanten Cs^+ Strom generieren und weil andere Kaliumkanäle sowie Kir Kanäle durch Cs^+ blockiert werden (McCloskey *et al.,* 1990; Wittekindt *et al*., 2004). Und so können die endogenen Ströme durch *h*SK3 Kanäle genauer identifiziert werden.

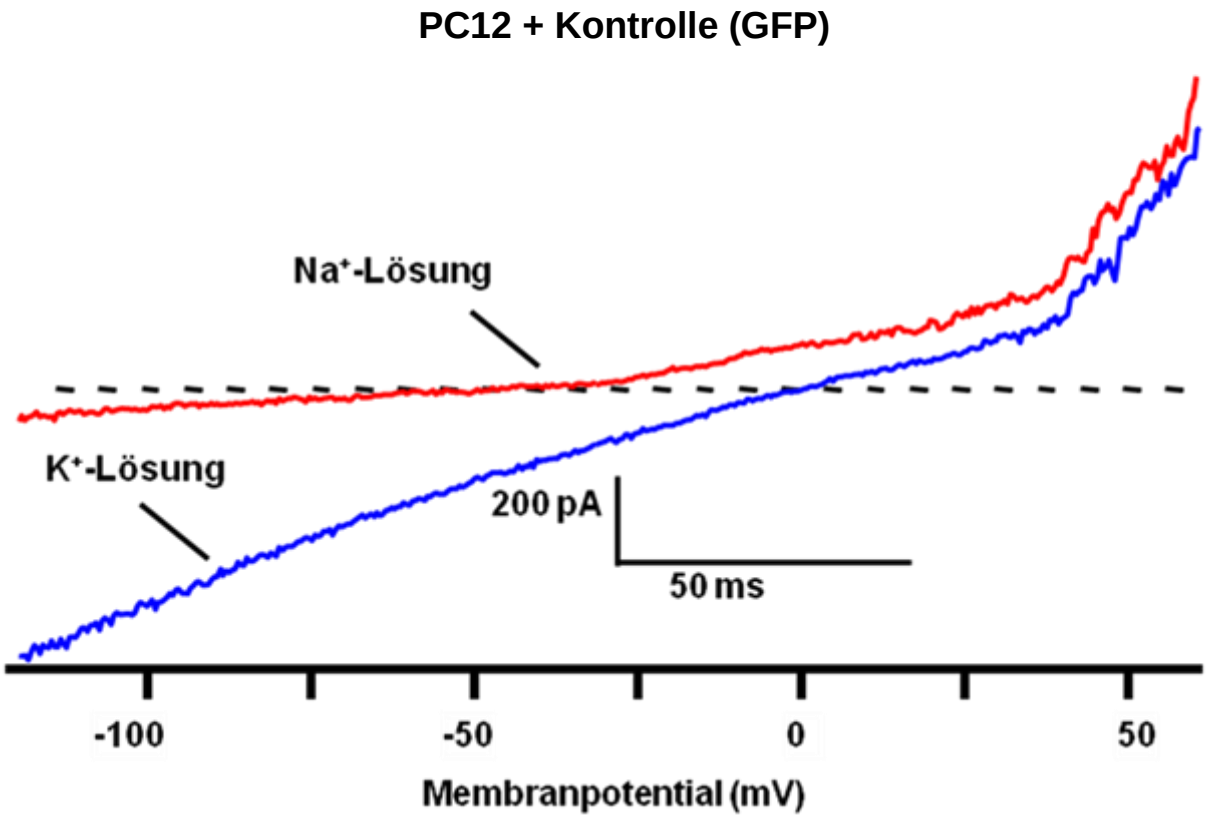


Abb. 5: Endogene Ströme durch *h*SK3 Kanäle in PC12 Zellen in Kontrollexperimenten.

Die Transfektion in PC12 Zellen erfolgte mit einer Kontrolle (GFP). Anschließend wurden Ganzzellstöme gemessen. Endogene Ströme durch *h*SK3 Kanäle wurden mit 1 µM freiem Ca^{2+} in der Pipette als intrazelluläre Lösung aktiviert, Na^+- und K^+-Lösungen wurden als externe Lösungen verwendet und Ströme wurden gemessen in dem das Membranpotential von -120 mV bis +60 mV innerhalb von 200 ms verändert wurde. Gezeigt sind repräsentative endogene Ströme durch *h*SK3 Kanäle in Zellen, die mit GFP transfiziert wurden.

3.2 Endogene *h*SK3 Ströme in PC12 Zellen in Kontrollexperimenten in Anwesenheit von Cs^+-Lösung

Abbildung 3 zeigt einen repräsentativen Versuch mit den Stromamplituden sowohl in Na^+- als auch in Cs^+-Lösung. Bei -80 mV in Na^+-Lösung betrug die Stromamplitude -12 pA und ist als Leckstrom zu betrachten. In Cs^+-Lösung nahm die Einwärtsstromamplitude von -120 mV bis ca. - 50 mV deutlich zu. Dies weist auf einen einwärtsgerichteten Cs^+ Strom durch *h*SK3 Kanäle hin, wie in der Literatur beschrieben (Wittekindt *et al*., 2004). Bei ca -45 mV war kein Strom zu messen und bei Potentialen positiver als -45 mV waren Auswärtsströme zu beobachten. Bei – 80 mV betrug die Stromamplitude ungefähr -248 pA.

Es wurden insgesamt 20 Messungen von Kontrollversuchen in Cs^+-Lösung durchgeführt. Der Mittelwert der Stromamplitude in Cs^+-Lösung bei -80 mV betrug -215 pA mit einer Standartabweichung von 67 pA.

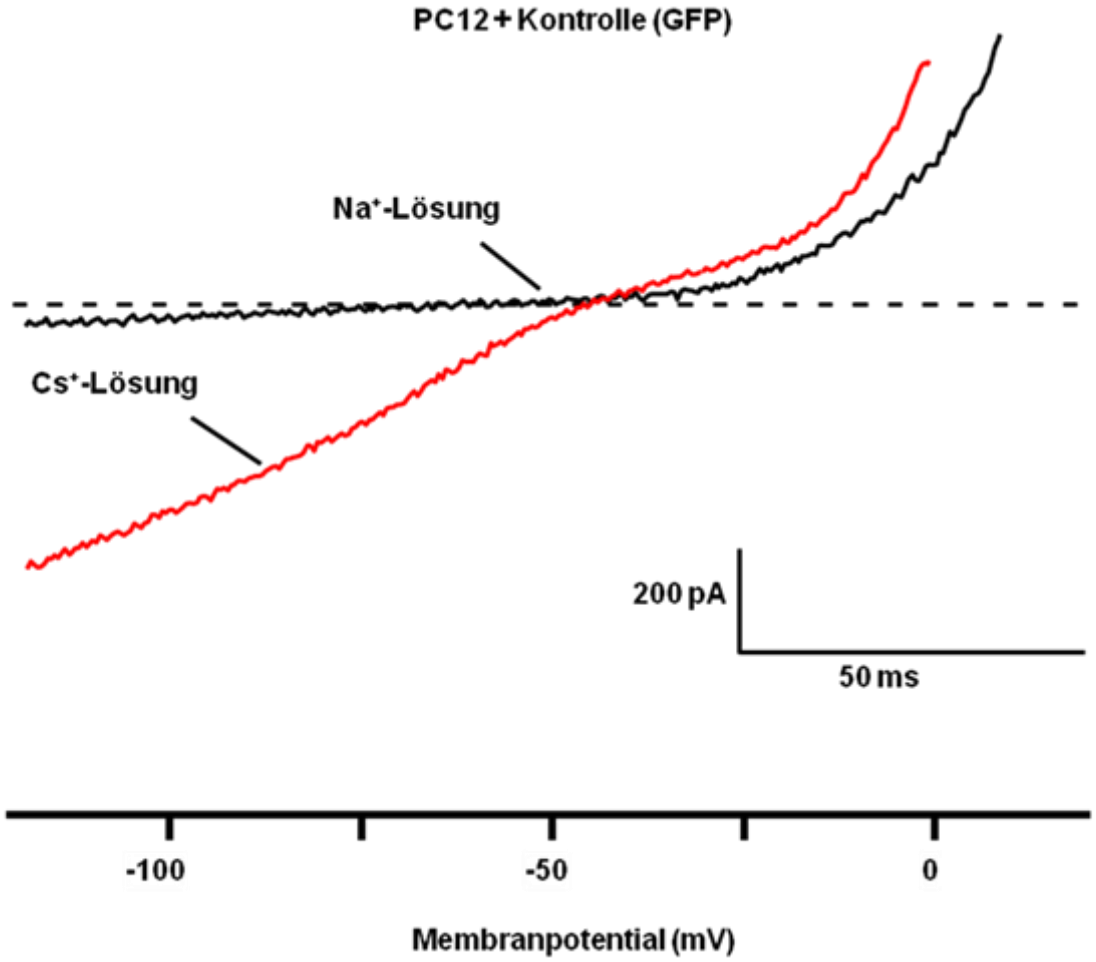


Abb. 6: Endogene SK3 Ströme in PC12 Zellen in Kontrollexpermenten in Anwesenheit von Cs^+-Lösung als externe Lösung.

SK3-Kanal Ströme wurden mit 1 µM freiem Ca^{2+} in der Pipette als intrazelluläre Lösung aktiviert, Na^+- und Cs^+-Lösungen wurden als externe Lösungen verwendet und Ströme wurden gemessen in dem das Membranpotential von -120 mV bis +60 mV innerhalb von 200 ms verändert wurde. Gezeigt sind repräsentative endogene Ströme in einer Zelle, die mit der Kontrolle (GFP) transfiziert wurden. Die Ströme wurden bei -80 mV gemessen.

3.3 Endogene Ströme durch *h*SK3 Kanäle in PC12 Zellen in Anwesenheit von Endophilin 3

Nachdem ich die endogenen Ströme durch *h*SK3 Kanäle in den PC12 Zellen gemessen hatte, die mit pEGFP-N1 (GFP) als Kontrolle transfiziert worden waren, konnte ich mit der elektrophysiologischen Untersuchung der Interaktionen von *h*SK3 mit Endophilin 3 beginnen. Für diese Untersuchungen wurden PC12 Zellen mit Endophilin 3 + GFP transfiziert und anschließend wurden Ganzzellströme gemessen. Abbildung 7 zeigt einen repräsentativen Versuch und zeigt den Stromverlauf einmal in Na^+- (schwarz) und einmal in Cs^+-Lösung (rot) von -120 mV bis +60 mV innerhalb von 200 ms. Bei Betrachtung der beiden Stromverläufe sieht man, dass beide Ströme von -120 mV bis ca. 0 mV fast identisch sind und der Strom bei -80 mV in beiden Lösungen ca. -3 pA beträgt. Selbst bei Vergrößerung der Stromskala, wie in unterem Abschnitt der Abbildung 7 zu sehen ist, war kein Unterschied in den Stromverläufen zu sehen. Diese Beobachtung habe ich an 12 von insgesamt 16 gemessenen Zellen gemacht. Somit ließ sich kaum *h*SK3 spezifischer Strom in Cs^+-Lösung nachweisen.

Bei den 16 PC12 Zellen, die mit Endophilin 3 transfiziert wurden, ergibt sich ein Mittelwert von der Stromamplitude in Cs^+-Lösung bei 80 mV von -5,5 pA.

Ich schloss aus diesen Ergebnissen, dass die Interaktion von Endophilin 3 mit *h*SK3 in meinen Versuchen mit PC12 Zellen stattfand und durch diese Interaktion die Expression oder die Funktion der normalerweise endogen exprimierten *h*SK3 Kanäle in PC12 Zellen moduliert wird.

Ob eher die Expression oder die Funktion der *h*SK3 Kanäle in PC12 Zellen durch die Interaktion mit Endophilin 3 beeinflusst wird, habe ich in weiteren Experimenten untersucht. Diese Versuche sind im nächsten Kapitel beschrieben.

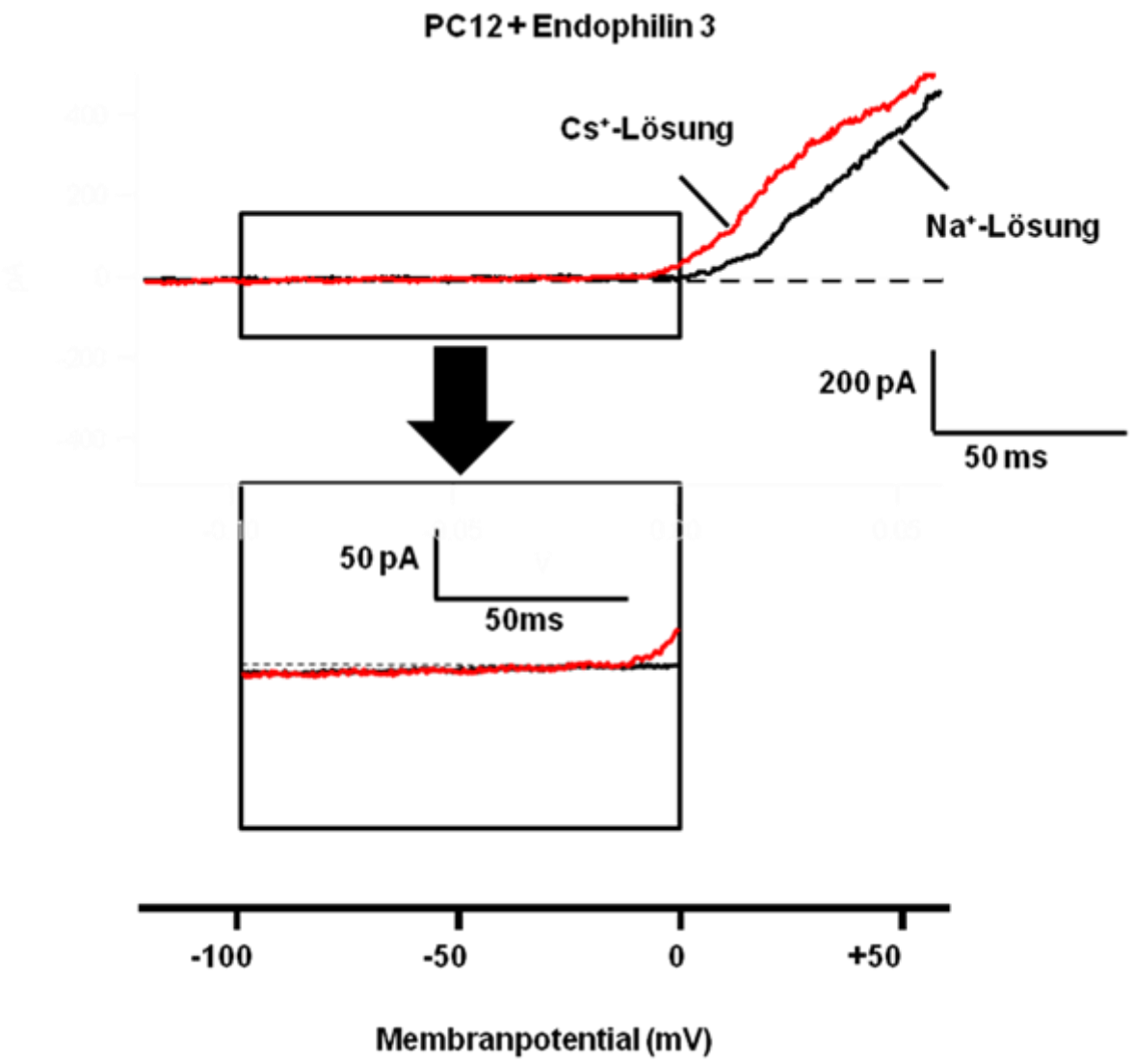


Abb. 7: Endogene SK3 Ströme in PC12 Zellen in Anwesenheit von Endophilin 3.

PC12 Zellen wurden mit Endophilin 3 transfiziert. *h*SK3 Ströme wurden mit 1 µM freiem Ca^{2+} in der Pipette als intrazelluläre Lösung aktiviert, Na^+- und Cs^+-Lösungen wurden als externe Lösungen verwendet und Ganzzellströme wurden gemessen, in dem das Membranpotential von -120 mV bis +60 mV innerhalb von 200 ms verändert wurde.

3.4 Überprüfung ob die *h*SK3/Endophilin 3-Interaktion möglicherweise die Kanalaktivierung endogener *h*SK3 Kanäle in PC12 Zellen durch DC-EBIO beeinflussen?

Den Ergebnissen von den Messungen in Cs^+-Lösung ist zu entnehmen, dass sich kein Strom durch *h*SK3 Kanäle nach der Transfektion mit Endophilin 3 + GFP in PC12 Zellen nachweisen liess. Dies könnte verschiedene Ursachen haben:

a. Endophilin 3 kann die Aktivierung von *h*SK3 Kanälen in der Membran verhindern.
b. Durch die Interaktion von Endophilin 3 mit *h*SK3 wird die Endozytose aktiviert und *h*SK3 Kanäle werden aus der Membran entfernt.

Beide Ursachen würden dazu führen, dass kein *h*SK3-spezifischer Strom in PC12 Zellen nachzuweisen wäre. Für den Fall, dass die Kanäle noch in der Membran sind, aber nicht aktiviert werden, wäre es eventuell möglich diese Kanäle über einen Kanalaktivator (DC-EBIO) zu öffnen und wenn dann ein *h*SK3-spezifischer Strom in mit Endophilin 3 transfizierten PC12 Zellen zu messen wäre, würde das darauf hindeuten, dass die *h*SK3 Kanäle in diesen PC12 Zellen doch noch in der Membran sind, aktivierbar über den Kanalaktivator aber in ihrer Kanalaktivität durch Endophilin 3 reduziert sind.

Um diese Möglichkeit von in Endophilin 3 transfizierten PC12 Zellen zu untersuchen, soll zunächst die Wirkung des einzusetzenden Kanalaktivators, DC-EBIO, an GFP-transfizierten PC12 Zellen untersucht werden.

4.4.1 Die Kanalaktivierung endogener *h*SK3 Kanäle in PC12 Zellen durch DC-EBIO in Kontrollexperimenten

GFP (pEGFP-N1) wurde PC12 Zellen für Kontrollexperimente exprimiert und endogene Ströme durch *h*SK3 Kanäle wurden durch 1 µM freies intrazelluläres Ca^{2+} aktiviert.

PC12 Zellen befanden sich zu Beginn der Experimente in Na^+-Lösung. Im Anschluss wurde die Badlösung mit Cs^+-Lösung ohne Zugabe bzw. Zumischung von DC-EBIO ausgetauscht und gemessen, um die endogenen Ströme durch *h*SK3 Kanäle zu identifizieren.

In Abbildung 8 ist ein repräsentativer Versuch gezeigt. Die Ströme wurden ausgelöst mit Spannungsrampen von -120 mV bis +60 mV (in Abbildung aus Übersichtsgründen nur bis +10 mV gezeigt) innerhalb von 200 ms. In Cs^+-Lösung war der Stromverlauf, wie aus den Vorversuchen zu erwarten und lag bei diesem Experiment bei -207 pA. Beim Wechsel der extrazellulären Lösung zu einer Cs^+-Lösung mit einer DC-EBIO Konzentration von 10 µM war eine Steigerung der Stromaplitude von -120 mV bis ca. -55 mV zu beobachten. Die Stromamplitude stieg bei -80 mV von -207 pA in Cs^+-Lösung ohne DC-EBIO auf -365 pA in Cs^+-Lösung mit 10 µM DC-EBIO. Somit steigerte sich die Stromamplitude um ca. 56%. Direkt im Anschluss tauschte ich die Badlösung erneut mit einer Cs^+-Lösung mit einer DC-EBIO Konzentration von 30 µM aus. Dabei stieg die Stromamplitude bei -80 mV auf -623 pA bzw. um ca. 76% vom Ausgangsstrom in Cs^+-Lösung ohne DC-EBIO. Beim nächsten Wechsel der Badlösung war die DC-EBIO Konzentration bei 100 µM und die Stromamplitude bei -80 mV lag bei -915 pA. Beim nächsten Austausch der Badlösung wurde die DC-EBIO Konzentration verdreifacht und stieg somit von 100 µM auf 300 µM. Hier war eine minimale Steigerung der Stromamplitude bei -80 mV von -915 pA auf -995 pA zu beobachten und damit ging ich davon aus, dass der maximale Strom bei der DC-EBIO Konzentration von ungefähr 300 µM zu erreichen war. Diese Ergebnissen bestätigten die Aktivierung von *h*SK3 Kanälen durch DC-EBIO (Pedarzani *et al*., 2001).

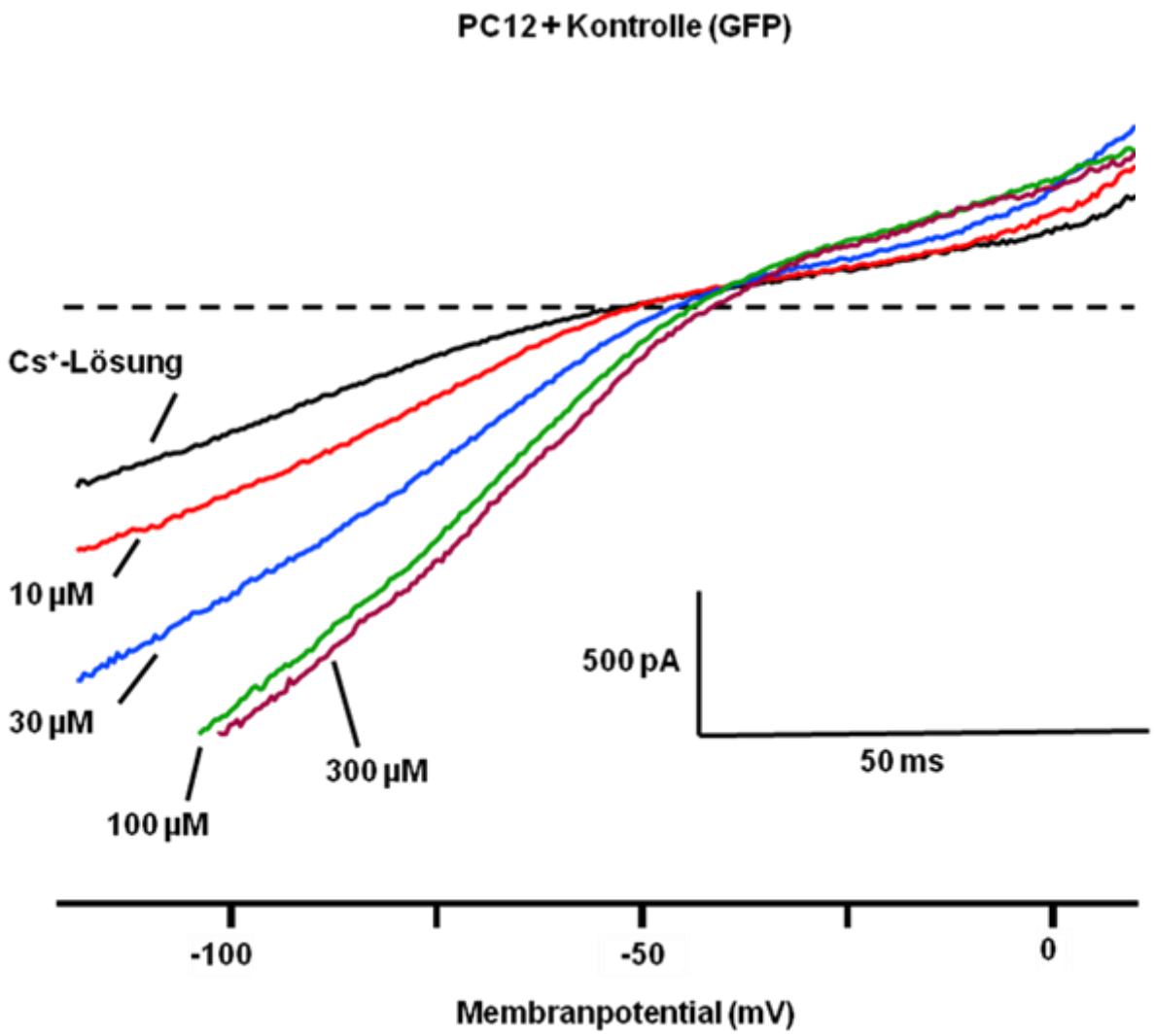


Abb. 8: Aktivierung endogener SK3 Ströme in Gegenwart von DC-EBIO in Kontroll-PC12 Zellen.

Die Transfektion in PC12 Zellen erfolgte mit einer Kontrolle (GFP). Anschließend wurden Ganzzellströme gemessen. Endogene *h*SK3 Ströme wurden mit 1 µM freiem Ca^{2+} in der Pipette als intrazelluläre Lösung aktiviert, Cs^{+}-Lösungen wurden als externe Lösungen ohne und mit DC-EBIO verwendet und Ströme wurden gemessen in dem das Membranpotential von -120 mV bis +60 mV innerhalb von 200 ms verändert wurde. Der Stromverlauf ist nur bis +10 mV gezeigt.

Für die weitere Analyse der Daten wurde nach der Zugabe der DC-EBIO-Konzentrationen eine Dosis-Wirkungskurve angefertigt. Diese ist in Abbildung 8 gezeigt.

Dosis-Wirkungskurve für DC-EBIO

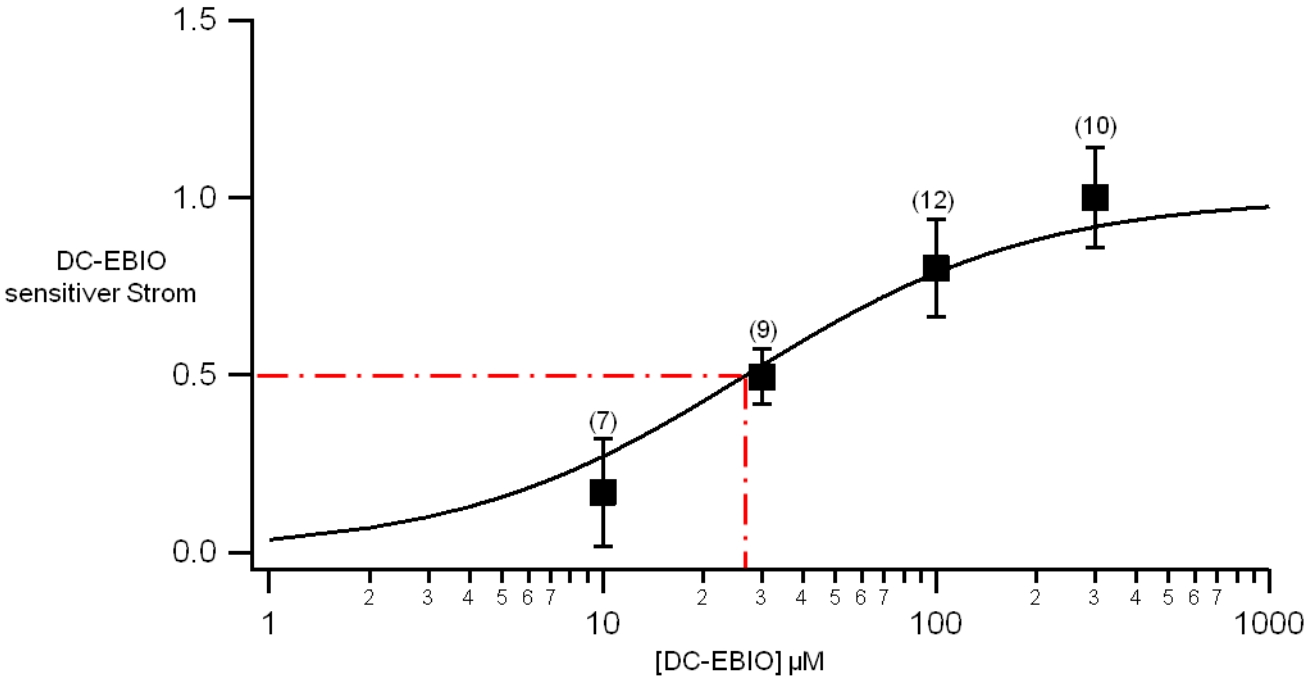


Abb. 9: Dosis-Wirkungskurve für DC-EBIO, Ströme durch *h*SK3 Kanäle zu aktivieren.

Die Datenpunkte wurden aus den normalisierten Strömen nach DC-EBIO-Applikation bei verschiedenen Konzentrationen gewonnen und die Mittelwerte aus unabhängigen Experimenten (Zahl der Experimente in Klammern oberhalb dem Datenpunkt) ± Standartabweichung sind dargestellt. Die durchgezogene Linie stellt das Anpassen einer modifizierten Hill Funktion an die Datenpunkte dar und zeigt einen EC_{50} von 28 µM. Die Kurve wurde per Auge und nach folgender Formel gefittet: *DC-EBIO-sensitiver-Strom* = 1/(1 + (EC_{50} /[DC-EBIO])), wobei EC_{50} die DC-EBIO Konzentration ist, bei der die Hälfte aller *h*SK3 Kanäle aktiviert sind.

Abbildung 9 zeigt den DC-EBIO sensitiven Strom gegen den Logarithmus der DC-EBIO-Konzentration in Cs^+-Lösung als Badlösung und die Dosis-Wirkungskurve als besten Fit. In Kontrollexperimenten lag der EC_{50} Wert bei 28 µM und der Hill Koeffizient bei 1.

Tabelle 3 gibt die Mittelwerte der gemessenen Ganzzellströme bei – 80 mV in pA in PC12 Zellen wieder.

Tab. 3: Tabellarische Darstellung der gemessenen Ganzzellströme bei – 80 mV in in PC12 Zellen. Die Spalten geben die verschiedenen Badlösungen wieder. Na^+: Natrium, Cs^+: Cesium, n: Anzahl der gemessenen Zellen, SD: Standartabweichung

Anzahl der gemessenen Zellen (n) n= 3-20	Na^+ (20)	Cs^+- (20)	Cs^+ + 10 µM DC-EBIO (n=7)	Cs^+ + 30 µM DC-EBIO (n=9)	Cs^+ + 100 µM DC-EBIO (n=12)	Cs^+ + 300 µM DC-EBIO (n=10)
Mittelwert der gemessenen Ganzzellströme bei - 80 mV in pA	-16	-215	-370	-633	-893	-1059
SD in pA	±7	±67	±91	±50	±122	±150

4.4.2 Die Kanalaktivierung endogener *h*SK3 Kanäle in Endophilin 3 transfizierten PC12 Zellen durch DC-EBIO

Nachdem sich die Aktivierung endogener *h*SK3 Kanäle durch DC-EBIO in den Kontrollversuchen bestätigte, untersuchte ich im Anschluss, ob sich endogene Ströme durch *h*SK3 Kanäle in den mit Endophilin 3 transfizierten PC12 Zellen nach der Aktivierung durch DC-EBIO messen lassen. Dazu transfizierte ich die PC12 Zellen mit Endophilin 3 und maß, nach bestimmter Inkubationszeit, die Ganzzellströme nach Zugabe verschiedener DC-EBIO Konzentrationen.

Abbildung 10 stellt einen Versuch mit Stromverläufen in einer PC12 Zelle nach Transfektion mit Endophilin 3 in verschiedenen Konzentrationen von DC-EBIO dar. Das Membranpotential wurde von -120 mV bis +60 mV innerhalb von 200 ms verändert und die Ströme gemessen. Da bei der Beurteilung und Charakterisierung der endogenen Ströme durch *h*SK3 Kanäle der Stromverlauf von -120 mV bis ca. 0 mV von Bedeutung war, stellt Abbildung 10 nur den Stromverlauf bis +10 mV dar.

Am Beginn der Messung waren die Zellen in Na^+-Lösung als extrazelluläre Lösung. Anschließend wurde die Badlösung mit einer Cs^+-Lösung ohne DC-EBIO ausgetauscht. Im Anschluss wurde die extrazelluläre Lösung auf die Cs^+-Lösung mit einer DC-EBIO Konzentration von 10, 30, 100 und 300 µM gewechselt. In allen getesteten DC-EBIO Konzentrationen war keine Veränderung der Stromamplitude von -120 mV bis ca. 0 mV zu sehen. Selbst bei der maximalen DC-EBIO Konzentration von 300 µM zeigte sich keine Veränderung der Stromamplitude und der Strom zeigte einen ähnlichen Verlauf wie in Cs^+-Lösung ohne DC-EBIO Zugabe.

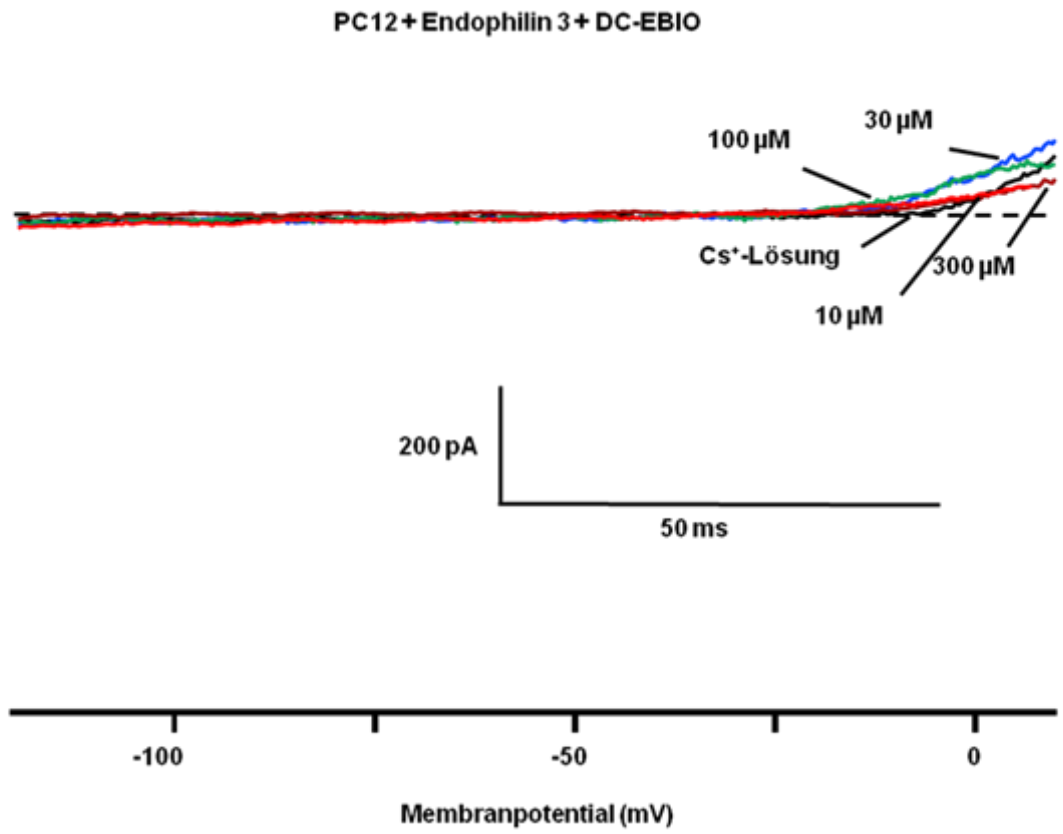


Abb. 10: Endogene hSK3 Ströme in PC12 Zellen in Anwesenheit von Endophilin 3 und DC-EBIO.

Die Transfektion in PC12 Zellen erfolgte mit Endophilin 3. Endogene Ströme durch *h*SK3 Kanäle wurden mit 1 µM freiem Ca^{2+} in der Pipette als intrazelluläre Lösung aktiviert, Cs^{+}-Lösungen wurden als externe Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen von DC-EBIO verwendet und Ströme wurden gemessen, in dem das Membranpotential von -120 mV bis +60 mV innerhalb von 200 ms verändert wurde.

Dieses Ergebnis wurde bei insgesamt 12 von 16 Zellen beobachtet, die mit Endophilin 3 transfiziert waren. Aus diesen Ergebnissen zog ich die Schlussfolgerung, dass sich kaum endogener Strom durch *h*SK3 Kanäle nach der Interaktion mit Endophilin 3 nachweisen lässt, auch nicht nach maximaler Aktivierung durch 300µM DC-EBIO. Durch die Interaktion könnte Endophilin 3 die *h*SK3 Kanäle von der Membran, möglicherweise über Endozytose, entfernen. Eine andere Möglichkeit, die Abwesenheit der Ströme zu erklären, wäre, dass sich die *h*SK3 Kanäle an der Membran befinden, jedoch durch die Interaktion inaktiv geworden sind.

Bei 4 von 16 PC12 Zellen war ein Strom nach Transfektion mit Endophilin 3 durch *h*SK3 Kanäle zu messen. Abbildung 11 zeigt einen Versuch mit den Stromamplituden von endogenen Strömen durch *h*SK3 Kanal in einer dieser 4 PC12 Zellen nach Transfektion mit Endophilin 3 in verschiedenen Konzentrationen von DC-EBIO. Dabei war in Cs^+-Lösung ohne DC-EBIO eine Stromamplitude von -9 pA bei -80 mV zu messen. Beim Wechsel auf eine Cs^+-Lösung mit der DC-EBIO Konzentration von 30 µM wurde die Stromamplitude größer und erreichte bei -80 mV -48 pA. Anschließend wurde die Konzentration von DC-EBIO durch Wechsel der extrazellulären Lösung auf 100 µM erhöht. Hier war die Stromamplitude bei -80 mV -130 pA. Am Ende wurde der Strom in Cs^+-Lösung mit der DC-EBIO Konzentration von 300 µM gemessen und lag bei -245 pA. In dieser Zellengruppe unterschied sich der Stromverlauf in Cs^+-Lösung mit und ohne DC-EBIO von dem Stromverlauf in den Kontrollversuchen. Der gemessene Strom war hier wesentlich kleiner als in den Kontrollversuchen.

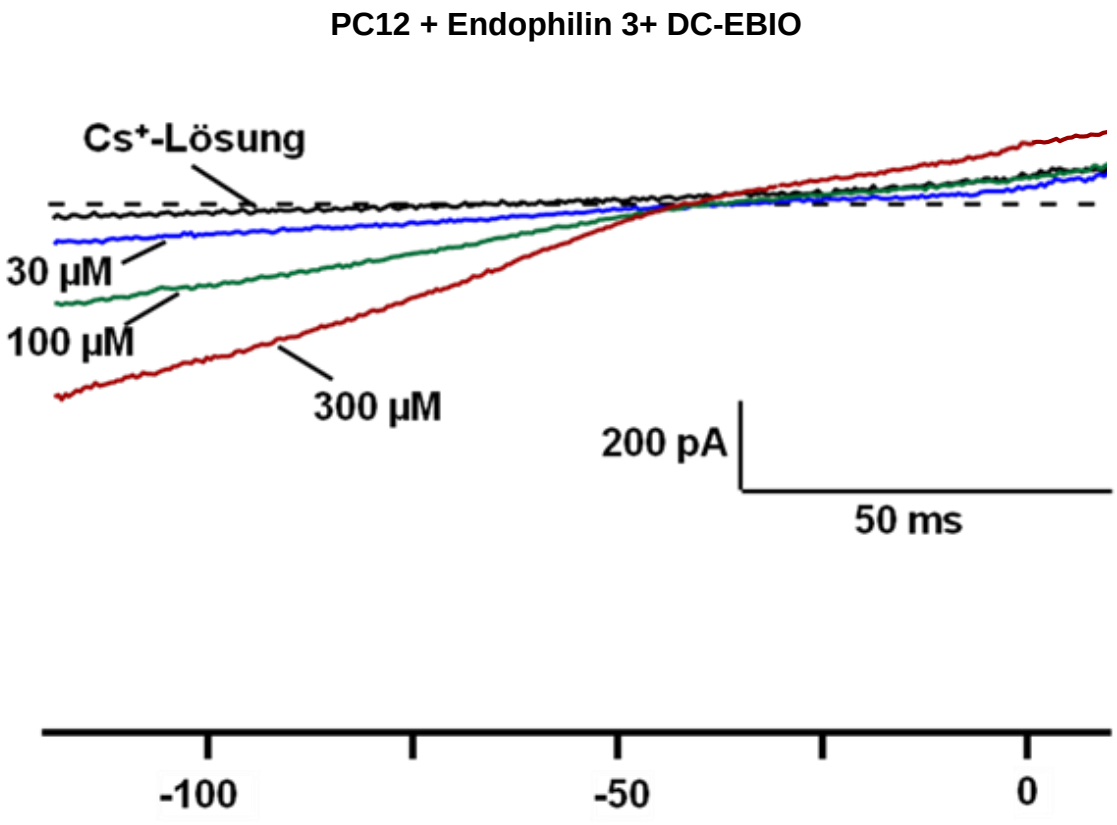


Abb. 11: Endogene SK3 Ströme in PC12 Zellen in Anwesenheit von Endophilin 3 und DC-EBIO.

Bei 4 von 16 gemessenen mit Endophilin transfizierten Zellen konnten endogene Ströme durch *h*SK3 nachgewiesen werden. Endogene Ströme durch *h*SK3 Kanäle wurden mit 1 µM freiem Ca^{2+} in der Pipette als intrazelluläre Lösung aktiviert, Cs^{+}-Lösungen wurden als externe Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen von DC-EBIO verwendet und Ströme wurden gemessen, in dem das Membranpotential von -120 mV bis +60 mV innerhalb von 200 ms verändert wurde. Der Stromverlauf ist nur bis +10 mV gezeigt.

Tabelle 4 gibt die Mittelwerte der gemessenen Ganzzellströme von den 4 PC12 Zellen, die nach der Transfektion mit Endophilin 3 Strom zeigten bei – 80 mV wieder.

Tab. 4: Tabellarische Darstellung der gemessenen Ganzzellströme bei – 80 mV in 4 PC12 Zellen, die mit Endophilin 3 transfiziert waren und *h*SK3-spezifischen Strom zeigten. Die Spalten geben die verschiedenen Badlösungen wieder, Cs^+: Cesium, n: Anzahl der gemessenen Zellen, SD: Standartabweichung

Anzahl der gemessenen Zellen (n) n= 4	Cs^+-	Cs^+ + 30 µM DC-EBIO	Cs^+ + 100 µM DC-EBIO	Cs^+ + 300 µM DC-EBIO
Mittelwert der gemessenen Ganzzellströme bei - 80 mV in pA	-13	-79	-144	-288
SD in pA	±7	±22	±15	±103

Abbildung 12 zeigt eine Dosis-Wirkungskurve, die für die weitere Analyse der Daten nach der Zugabe der DC-EBIO-Konzentrationen angefertigt wurde. Dargestellt ist der DC-EBIO-sensitive Strom gegen den Logarithmus der DC-EBIO-Konzentration in Cs^+-Lösung als Badlösung und die Dosis-Wirkungskurve als besten Fit. Die Bestimmung des EC_{50} Wertes ergab 100 µM und der Hill Koeffizient war 1.

Dosis-Wirkungskurve für DC-EBIO in Anwesenheit von Endophilin 3

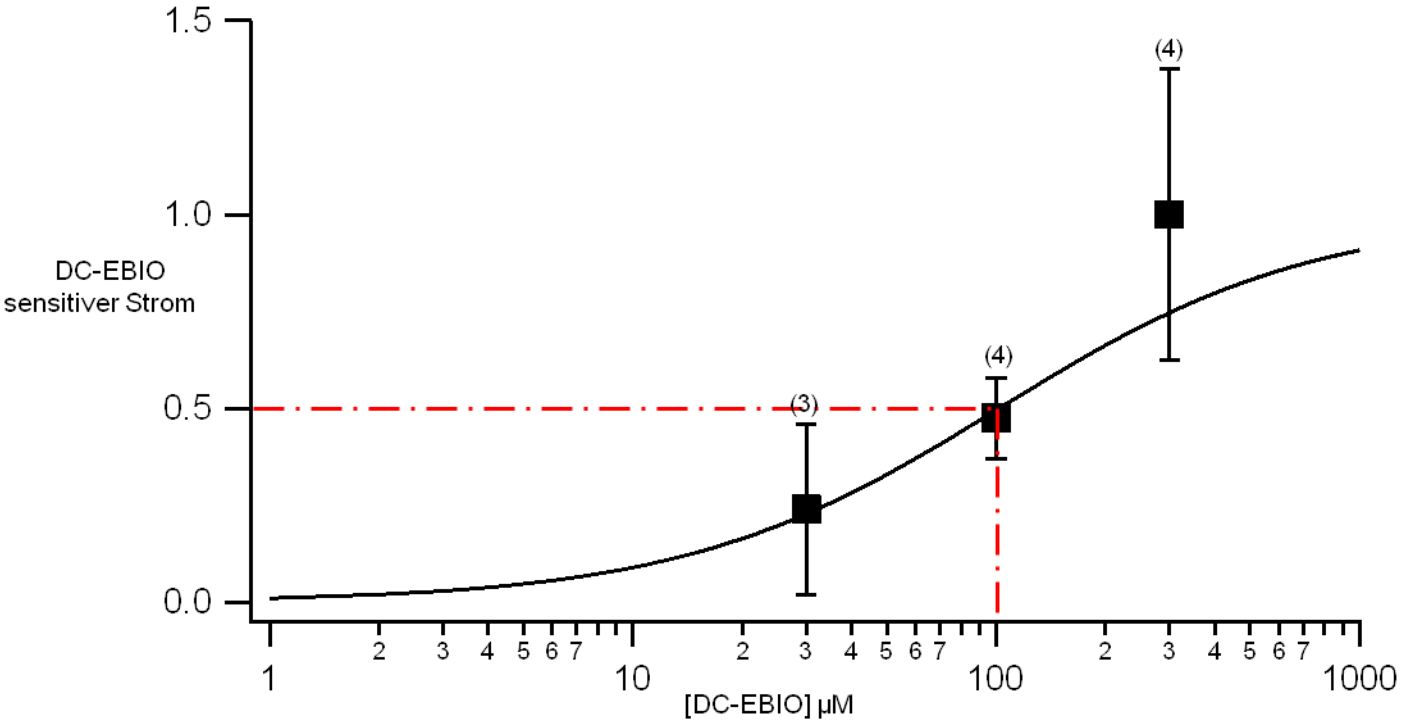


Abb. 12: Dosis-Wirkungskurve für DC-EBIO, Ströme durch *h*SK3 Kanäle zu aktivieren in den 4 PC12, die mit Endophilin 3 transfiziert wurden.

Die Datenpunkte wurden aus den normalisierten Strömen nach DC-EBIO-Applikation bei verschiedenen Konzentrationen gewonnen und die Mittelwerte aus insgesamt 4 unabhängigen Experimenten ± Standartabweichung sind dargestellt. Die durchgezogene Linie stellt das Anpassen einer modifizierten Hill Funktion an die Datenpunkte dar und zeigt einen EC_{50} von 100 µM. Die Kurve wurde per Auge und nach folgender Formel gefittet: *DC-EBO-sensitiver-Strom* = $1/(1 + (EC_{50} /[\text{DC-EBIO}])^{nH})$, wobei EC_{50}: die DC-EBIO Konzentration, bei der die Hälfte aller *h*SK3 Kanäle aktiviert sind, und *n*H: der Hill Koeffizient ist und betrug 1.

Wie man den Dosis-Wirkungskurven entnehmen kann, war die Sensitivität der *h*SK3 Kanäle gegenüber DC-EBIO durch die Expression von Endophilin 3 reduziert.

Der EC_{50} Wert lag in den Kontrollversuchen bei 28 µM und in den Versuchen mit Endophilin 3 bei 100 µM.

Aus diesen Ergebnissen bin ich auf die Schlossfolgerung gekommen, dass Endophilin 3 mit endogenen *h*SK3 Kanälen in PC12 Zellen interagierten und zu einer Veränderung der DC-EBIO Sensitivität führten.

4. Diskussion

5.1 Der elektrophysiologische Nachweis der Interaktion von Endophilin 3 mit *h*SK3 Kanälen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die nachgewiesene Interaktion von Endophilin 3 mit dem *h*SK3 Kanal elektrophysiologisch mittels patch-clamp-Technik untersucht. Mit Hilfe elektrophysiologischer Versuche an PC12 Zellen, welche endogene *h*SK3 Kanäle besitzen, untersuchte ich eine mögliche physiologische Bedeutung der Interaktionen des Endophilin 3 mit dem *h*SK3 Kanal. Dazu exprimierte ich Endophilin 3 Konstrukte in PC12 Zellen. Nach einer Inkubation von 2-3 Tagen habe ich endogene Ströme durch *h*SK3 Kanäle in den PC12 Zellen gemessen. Die elektrophysiologischen Messungen ergaben, dass sich nach der Exprimierung von Endophilin 3 in den PC12-Zellen der Stromverlauf durch die *h*SK3 Kanäle verändert hatte. Anhand der Messungen konnte ich bei den meisten Zellen kein Strom durch *h*SK3 Kanäle nachweisen. Damit konnte ich die Interaktion von Endophilin 3 mit dem *h*SK3 Kanal in Säugerzellen bestätigen.

Anschließend wurde die Interaktion unter DC-EBIO-Wirkung untersucht. DC-EBIO erhöht die Ca^{2+} Sensitivität von *h*SK3 Kanälen und es wird vermutet, dass dies durch eine Stabilisierung der Bindung von Ca^{2+}/ CaM und dem C-Terminus erfolgt. Auch nach Aktivierung endogener *h*SK3 Kanäle durch DC-EBIO zeigte sich in den meisten gemessenen Zellen kein Nachweis von endogenen Strömen durch die *h*SK3 Kanäle.

In wenigen Messungen von PC12 Zellen, die mit Endophilin 3 + GFP transfiziert wurden, konnte ein Strom nachgewiesen werden. Die Stromamplitude dieses nachgewiesenen Stroms unterschied sich jedoch von der Stromamplitude in den Kontrollversuchen. Insgesamt war der gemessene Strom in Anwesenheit von Endophilin 3 viel kleiner als in den Kontrollzellen. Zusätzlich dazu zeigte sich eine reduzierte DC-EBIO Sensitivität.

Ob *h*SK3 Kanäle nach der Interaktion mit Endophilin 3 von der Membran entfernt werden und somit die Reduktion der Stromamplitude erklären könnte oder, ob sich die Kanäle noch oder in der Membran befinden ohne aktiviert werden zu können, werde ich in einem der folgenden Kapitel diskutieren. Dabei werde ich die

verschiedenen Mechanismen darstellen, die bei der Interaktion von *h*SK3 mit dem Endophilin 3 eine Rolle spielen. Zunächst aber möchte ich darlegen, wie Endophiline bei der Endozytose mitwirken.

5.2 Die Rolle von Endophilinen bei der Endozytose

Eine Rolle der Endophiline bei der Endozytose konnte anhand von Endophilin 1 (SH3GL2) gezeigt werden (Ringstad *et al.*, 1999; Gad *et al.*, 2000).

Die clathrinvermittelte Endozytose dient der Wiederverwertung von Membranvesikeln, wie es in der Präsynapse bei der Freisetzung von Neurotransmittern stattfindet. Der genaue Mechanismus der Endozytose wird wie folgt beschrieben: An synaptischen Nervenendungen führt die Depolarisation der Zellmembran durch ein ankommendes Aktionspotential zum Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle vom N- und P/Q-Typ. Die daraus folgende intrazelluläre Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration führt zur exozytotischen Transmitterfreisetzung und setzt den Mechanismus der Wiederverwertung von Membranvesikeln durch clathrinvermittelte Endozytose in Gang. Gleichzeitig führt dieser intrazelluläre Ca^{2+}-Anstieg auch zur Öffnung von Ca^{2+}-abhängigen K^+-Kanälen und dadurch zur Hyperpolarisation der präsynaptischen Membran durch den erhöhten K^+-Ausstrom. Das führt dazu, dass über die Schließung der spannungsabhängigen Ca^{2+}-Kanäle weniger Ca^{2+} in die Zelle einströmen kann und die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration sinkt. Durch diesen negativen Rückkopplungsmechanismus wird die Exozytose an der präsynaptischen Membran wieder gebremst.

Bei der clathrinvermittelten Endozytose wird zwischen zwei Arten von Proteinen unterschieden. Die sogenannten Mantel („Coat“) -Proteine, die sich wie ein Mantel um die Membraneinstülpung des entstehenden Vesikels legen, wie zum Beispiel Clathrin, AP2 und AP180, und die assoziierten Proteine, die eine andere Rolle in diesem Mechanismus übernehmen. So scheint Endophilin 1 nach Bindung der Clathrinmoleküle an die Zellmembran für die Krümmung des entsprechenden Membranabschnitts erforderlich zu sein und wahrscheinlich auch bei der Abschnürung des Vesikels von der Membran benötigt zu werden (Hill *et al.*, 2001).

Ein Glutathion *S*-Transferase-Fusionsprotein, das nur die SH3-Domäne von

Endophilin 1 enthält, kann die Endozytose inhibieren (Simpson *et al.*, 1999). Auch die GTPase Dynamin und die Inositol-5-Phosphatase Synaptojanin scheinen an der clathrinvermittelten Endozytose mitzuwirken. Beide Proteine enthalten prolinreiche Abschnitte, über die sie mit den SH3-Domänen von Endophilin 1 – 3 interagieren und liegen in präsynaptischen Nervenendungen colokalisiert mit ihnen vor (Ringstad *et al.*, 1997). Endophiolin 3 kann durch seine N-terminalen Abschnitte mit der Coiled-Coil-Domäne dimerisieren (Reutens und Begley, 2002). Es ist denkbar, dass die dabei freien SH3-Domänen der beiden Endophilin 3 Proteine mit zwei verschiedenen anderen Bindungspartnern interagieren. So könnten sie eine Art Verbindungsfunktion zwischen verschiedenen an der Endozytose beteiligten Proteinen einnehmen.

5.3 Mechanismus der Interaktion von Endophilin 3 mit *h*SK3 Kanälen

Wie im Teil der Ergebnisse beschrieben ist, interagierte Endophilin 3 mit dem *h*SK3 Kanal und veränderte seine Funktion bzw. seine Aktivität. Im folgenden Abschnitt werde ich die möglichen Mechanismen zusammenfassen, die erklären können, wie eine Interaktion von *h*SK3 und Endophilin 3 die Reduktion von Strom durch *h*SK3 Kanäle verursachen kann.

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass die Interaktion zwischen Endophilin 3 und dem *h*SK3 Kanal in den meisten Fällen dazu führt, dass kein Strom durch *h*SK3 Kanäle zu messen war. In wenigen Zellen war ein Strom nachweisbar. Als Ursache dafür könnten folgende Mechanismen diskutiert werden:

a. Durch die Interaktion von Endophilin 3 mit *h*SK3 wird die Endozytose aktiviert und *h*SK3 Kanäle werden aus der Membran entfernt.

b. Endophilin 3 kann die Aktivierung von *h*SK3 Kanäle durch die Interaktion verändern ohne die Kanäle aus der Membran zu entfernen.

Vermutlich spielen beide Mechanismen der Stromreduktion (a bzw. b) eine Rolle bei der nachgewiesen Interaktion.

Spindler konnte im Rahmen ihrer Arbeit nachweisen, dass durch den Einsatz verschiedener *h*SK3-Konstrukte mit unterschiedlicher Länge der zweiten Polyglutaminsequenz des Kanales nur ein Konstrukt mit 19, nicht jedoch ein Konstrukt mit nur 14 Glutaminwiederholungen mit Endophilin 3 interagierte. Folglich

war, dass die Interaktion von Endophiln 3 am N-Terminus von *h*SK3 Kanal stattfindet und abhängig von der Länge der variablen Polyglutaminsequenz.

Frei veröffentlichte, dass der N-Terminus von *h*SK3 mit dem C-Terminus interagiert. Dabei wurde gezeigt, dass N-C Interaktionen die Kanalaktivierung des *h*SK3 Kanals modulieren (Frei *et al.,* 2006). Es wäre auch vorstellbar, dass Endophilin 3 mit N-C Interaktionen innerhalb oder zwischen den *h*SK3 Untereinheiten konkurriert und die Funktion von *h*SK3 verändert.

In 12 von insgesamt 16 gemessenen Zellen, die mit Endophilin 3 + GFP transfiziert waren, konnte auch unter DC-EBIO Wirkung kein Strom nachgewiesen werden. Somit fanden sich keine funktionellen *h*SK3 Kanäle in der Membran. Dies ließe sich dadurch erklären, dass sich gar keine *h*SK3 Kanäle mehr in der Membran befinden. Dies wiederum könnte durch Endozytose zustande kommen und würde implizieren, dass die Interaktion von Endophilin 3 mit dem N-Terminus von *h*SK3 eine Endozytose induziert, die die *h*SK3 Kanäle aus der Membran entfernt.

Alternativ dazu könnten sich die *h*SK3 Kanäle noch in der Membran befinden, wären allerdings nicht aktivierbar, könnten sich also durch die Interaktion von Endophilin 3 mit dem Kanal nicht mehr öffnen.

In den restlichen 4 von den insgesamt 16 gemessenen Zellen ließ sich ein *h*SK3-spezifischer Strom nachweisen, der sich allerdings in der Amplitude von den Kontrollversuchen unterschied. Die Reduktion der Stromamplitude von *h*SK3 Kanälen in diesen Zellen bedeutet, dass sich funktionelle *h*SK3 Kanäle noch in der Membran befinden. Diese *h*SK3 Kanäle sind jedoch durch die Interaktion mit Endophilin 3 in ihrer Funktion verändert. Dabei zeigte sich eine kleinere Stromamplitude sowie eine deutliche Veränderung bzw. Reduktion der DC-EBIO Sensitivität im Vergleich zu den Kontrollzellen. Von DC-EBIO weiß man, dass es die Ca^{2+} Sensitivität von *h*SK3 Kanälen erhöht und es wird angenommen, dass die DC-EBIO Sensitivität durch den C-Terminus von *h*SK3 Kanälen vermittelt wird (Pedarzani *et al*., 2001). Da die Interaktion mit Endophilin 3 am N-Terminus stattfindet, könnte eine N-C Interaktion die DC-EBIO Sensitivität durch eine Behinderung der DC-EBIO Bindungsstelle oder durch das Stören des DC-EBIO Aktivierungsmechanismus verändern. Das würde bedeuten, dass Endophilin 3 am *h*SK3 Kanal hängt und die Aktivierung des Kanals erschwert. Dadurch wird die Stromamplitude kleiner und auch die Aktivierung von DC-EBIO davon beeinflusst.

Vermutlich spielen beide Mechanismen der Stromreduktion (a bzw. b) eine Rolle bei der nachgewiesen Interaktion.

5.4 Bedeutung und Funktion der Interaktion von dem Endophilin 3 mit *h*SK3 Kanälen

Die nachgewiesene Interaktion zwischen Endophilin 3 und *h*SK3 führt zu einer Reduktion von funktionellen *h*SK3 Kanälen. Bei den Prozessen, bei denen die *h*SK3 Kanalaktivität eine wichtige Rolle spielt, könnte die oben genannte Interaktion zwischen Endophilin 3 und dem *h*SK3 Kanal einen Einfluss haben.
Es wird z.B. vermutet, dass die *h*SK3-Kanalaktivität eine Rolle bei Erinnerungs- und Lernprozessen spielt (Messier *et al.*, 1991; Stackman *et al.*, 2002). Auch die Gedächtnisbildung durch Modifizierung der spezifischen neuralen Pfade mittels Synapsensprossung im Säugerhirn wird diskutiert (Kleim *et al.*, 2002). Damit ist die Expression des SK3-Kanals in der Zellmembran, bzw. der Strom des Kanals, wichtig für die Aktivität der Neurone.
Untersuchungen in zellfreien Systemen und an Riesensynapsen des Neunauges haben ergeben, dass Endophilin dort eine wichtige Rolle für die Ausbildung der Synapsenstruktur und die synaptische Transmission spielt (Rikhy *et al*., 2002). Durch die Interaktion mit dem Endophilin 3 wäre folglich eine Einflussnahme von *h*SK3-Kanälen auf die Synaptogenese und somit auf die Gedächtnisbildung denkbar.

5.5 Bekannte Protein-Ionenkanal-Interaktionen und deren Bedeutung für die Kanalaktivierung

Wie aus der Literatur bekannt, kann eine Interaktion von einem Protein mit einem Ionenkanal dazu führen, dass die Aktivierung von Ionenkanälen auf unterschiedlichste Weise moduliert wird.
Im folgenden Abschnitt stelle ich ein bekanntes Beispiel für eine Protein-Ionenkanal-Interaktion dar. Es handelt sich um die Interaktion von Cortactin mit dem K_v10.1 Kanal. K_v10.1, ein spannungsabhängiger K^+-Kanal, wird in vielen Krebszellen exprimiert und ist an dem Beginn und der Progressin des Tumorprozesses beteiligt.

Seine Fähigkeit die Zellen in einer onkologischen Relevanz zu transformieren sowie seine Aktion als Onkoprotein, zeichenen den Kanal aus (Wulff *et al.,* 2009; Pardo *et al.,* 1999).

Cortactin ist ein multifunktionelles Protein und hat eine wichtige Funktion in diversen Signalkaskaden der eukaryontischen Zelle. Das Protein wurde als Aktinfilament-Bindeprotein und Hauptsubstrat der onkogenen v-Src-Kinase entdeckt und gilt mittlerweile als ein zentrales Signalprotein, das an zahlreichen Aktin-basierten zellulären Prozessen beteiligt ist. Cortactin spielt bei der Zelladhäsion, Endozytose, Zellwanderung, Tumorinvasion, Zellmorphogenese und in mikrobiellen Infektionen eine bedeutende Rolle (Weed *et al.,* 2000; Ammer *et al.,* 2008).

Wie Endophilin 3 besitzt Cortactin an seinem C Terminus eine SH3-Domäne, Src homology 3 domain, die als Bindungsstelle für viele seiner Interaktionspartner ist (Ammer *et al.,* 2008).

Eine Co-lokalisation von Cortactin mit K_v10.1 wurde *in vivo* und in *Xenopus* Oozyten beobachtet.

Herrmann und Kollegen (2012) zeigten neulich anhand biochemischer und elektrophysiologischer Versuche, dass eine funktionelle Interaktion zwischen Cortactin und K*v*10.1 *in vivo* stattindet. Die Art dieser Interaktion ist in meiner Arbeit mit der Interaktion von Endophilin 3 mit *h*SK3 zu vergleichen Der K_v10.1 Kanal interagiert an seinem C-Terminus direkt mit der prolin-reichen Region von Cortactin. Diese Interaktion ist somit spezifisch für K_v10.1 und kommt nicht in den K_v10.2 Kanälen vor. Durch die Interaktion mit K_v10.1 kontrolliert Cortactin die Dichte der K_v10.1 Kanäle an der Membran und ist für ihre funktionelle Expression an der Membran notwendig. Die Ergebnisse zeigten, dass die Cortactin-Expression essentiell für die Expression von K_v10.1 ist. Cortactin stabilisiert die Kanäle an der Membran ohne die Leitfähigkeit bzw. die Öffnungsfähigkeit der Einzelkanäle zu beeinflussen. Beim Verglich dieser Ergebnisse mit den Ergebnissen im Rahmen meiner Arbeit bei der Interaktion von Endophilin 3 mit dem Kanal *h*SK3 zeigt sich, dass Endophilin 3 nicht essentiell für die Expression der *h*SK3 Kanäle ist, beeinflusst jedoch wahrscheinlich die Öffnungsfähigkeit der Einzelkanäle. Da Cortactin keinen Einfluss auf die Stromamplitude der K_v10.1 Einzelkanäle hat, geht man davon aus, dass Cortactin an der Regulation bzw. den Endozytose-Prozessen von Kv10.1 Kanälen beteiligt ist.

Es ist jedoch bekannt, dass Cortactin-Abbau bzw. Abwesenheit zu einer Reduktion der Clathrinvermittelten Endozytose führt (Cao *et al.,* 2004; Chen *et al.,* 2006).
So spielt Cortactin unter normalen Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle bei der Endozytose von Kv10.1 Kanälen. Eine Überexpression von Cortactin, wie bei den Tumoren oft der Fall ist, führt jedoch deutlich zu einer Reduktion der Endozytoserate von Kv10.1 Kanälen (Schuuring *et. al.,* 1992; Herrman *et al.,* 2012).
Ob Endophilin 3 im Rahmen der Interaktion mit hSK3 Kanal eine Rolle bei der Endozytose spielt kann nicht ausgeschlossen werden.

5. Zusammenfassung

Endophilin 3, gehört neben Endophilin 1 und 2 zu der Endophilin-Familie und wird im Hirn exprimiert. Seine Funktion ist noch nicht untersucht. Da aber Endophilin 1 eine Rolle bei der Endozytose spielt (Ringstad *et al.*, 1999; Gad *et al.*, 2000), wird vermutet, dass Endophilin 3 eine ähnliche Aufgabe bei der Endozytose hat.

Es ist bekannt, dass Endophilin 3 mit dem Protein Huntingtin via seine SH3-Domäne interagiert (Sittler *et al.*, 1998). Huntingtin-Protein ist im Gehirn vor allem in neuronalen Zellkörpern, Dendriten und Nervenendungen nachweisbar. Es ist mit der Huntington-Krankheit verknüpft, einer autosomal-dominant vererbten, progressiv verlaufenden neurologischen Störung.

Da der N-terminale zytosolische Anteil des *h*SK3-Kanals (Humaner Ca^{2+} aktivierter K+ Kanal kleiner Leitfähigkeit 3) große strukturelle Ähnlichkeit mit dem Protein Huntingtin, aufweist, wurde im Rahmen von Vorversuchen zu dieser Arbeit eine mögliche Interaktion zwischen *h*SK3 Kanälen und Endophilin 3 untersucht. Diese Arbeiten hatten gezeigt, dass Endophilin 3 sowohl in Hefe-Zwei-Hyprid Versuchen als auch biochemisch mittels PolyHis-Pull-Down-Assay-Methode mit dem *h*SK3 Kanal interagiert (Spindler *et al.,* 2003; Hoppner *et al.*, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion von Endophilin 3 mit dem *h*SK3 Kanal elektrophysiologisch in Säugerzellen untersucht.

1. Dazu wurde Endophilin 3 in PC12 Zellen (Phäochromocytom-Zelllinie der Ratte), die endogen *h*SK3 Kanäle besitzen, exprimiert und es wurde untersucht ob die Interaktion in Säugerzellen stattfindet. Meine Versuche deuten darauf hin, dass die Interaktion zwischen Endophilin 3 und dem *h*SK3 Kanal auch in Säugerzellen stattfindet.
2. Durch die Interaktion von Endophilin 3 mit dem *h*SK3 Kanal wurde die Kanalaktivierung von *h*SK3 verändert. Meine Untersuchungen zeigten, dass die endogenen Ströme durch *h*SK3 Kanäle nach der Interaktion mit Endophilin 3 stark reduziert sind.
3. In weiteren Versuchen konnte ich zeigen, dass die Interaktion von Endophilin 3 die Pharmakologie endogener *h*SK3 Kanäle gegenüber der

Substanz DC-EBIO (5,6-dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro 2H-benzimidazol-2-one) moduliert.

4. Es konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Expression der *h*SK3 Kanäle durch die Expression von Endophilin 3 vrändert war. Ob sich die *h*SK3 Kanäle tatsächlich nicht mehr in der Membran befinden, lässt sich anhand der vorliegenden Versuche nicht genau aussagen.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ziehe ich die Schlussfolgerung, dass die Interaktion von Endophilin 3 mit *h*SK3 Kanälen in Säugerzellen stattfindet und für die Kanalfunktion von Bedeutung ist. Wie bereits erwähnt spielt die *h*SK-Kanalaktivität eine Rolle bei Erinnerungs- und Lernprozessen spielt (Messier *et al.*, 1991; Stackman *et al.*, 2002). Eine durch die Interaktion mit Endophilin 3 verringerte Sensitivität bzw. Aktivität der *h*SK3 Kanäle Könnte also zur Verbesserung des Lernverhaltens führen.

6. Literaturverzeichnis

1. Ammer, A. G., Weed, S. A. (2008). Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell motility and the cytoskeleton* **65**, 687–707.

2. Antonarakis, S. E., Blouin, J. L., Lasseter, V. K., Gehrig, C., Radhakrishna, U., Nestadt, G., Housman, D. E., Kazazian, H. H., Kalman, K., Gutman, G., Fantino, E., Chandy, K. G., Gargus, J. J., Pulver, A. E. (1999). Lack of linkage or association between schizophrenia and the polymorphic trinucleotide repeat within the KCNN3 gene on chromosome 1q21. *Am. J. Med. Genet.* **88**, 348–351.

3. Behrens, M. I., Jalil, P., Serani, A., Vergara, F., Alvarez, O. (1994). Possible role of apamin-sensitive K^+ channels in myotonic dystrophy. *Muscle Nerve* **17**, 1264–1270.

4. Blank, T., Nijholt, I., Kye, M.-J., Radulovic, J., Spiess, J. (2003). Small-conductance, Ca^{2+}-activated K^+ channel SK3 generates age-related memory and LTP deficits. *Nat. Neurosci.* **6**, 911–912.

5. Blatz, A. L., Magleby, K. L. (1986). Single apamin-blocked Ca-activated K^+ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* **323**, 718–720.

6. Blatz, A. L., Magleby, K. L. (1987). Calcium-activated potassium channels. *Trends Neurosci.* **11**, 463-467.

7. Bonnet-Brilhault, F., Laurent, C., Campion, D., Thibaut, F., Lafargue, C., Charbonnier, F., Deleuze, J. F., Ménard, J. F., Jay, M., Petit, M., Frebourg, T., Mallet, J. (1999). No evidence for involvement of KCNN3 (*h*SKCa3) potassium channel gene in familial and isolated cases of schizophrenia. *Eur. J. Hum. Genet.* **7**, 247–250.

8. Bosch, M. A., Kelly, M. J., Rønnekleiv, O. K. (2002). Distribution, neuronal colocalization, and 17beta-E2 modulation of small conductance calcium-activated K(+) channel (SK3) mRNA in the guinea pig brain. *Endocrinology* **143**, 1097–1107.

9. Brzustowicz, L. M., Hodgkinson, K. A., Chow, E. W., Honer, W. G., Bassett, A. S. (2000). Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-q22. *Science (New York, N.Y.)* **288**, 678–682.

10. Cahalan, M., Neher, E. (1992). Patch clamp techniques: an overview. *Meth. Enzymol.* **207**, 3–14.

11. Cao, H., Orth, J. D., Chen, J., Weller, S. G., Heuser, J. E., McNiven, M. A. (2003). Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2162–2170.

12. Cardno, A. G., Bowen, T., Guy, C. A., Jones, L. A., McCarthy, G., Williams, N. M., Murphy, K. C., Spurlock, G., Gray, M., Sanders, R. D., Craddock, N., McGuffin, P., Owen, M. J., O'Donovan, M. C. (1999). CAG repeat length in the *h*KCa3 gene and symptom dimensions in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **45**, 1592–1596.

13. Chandy, K. G., Fantino, E., Wittekindt, O., Kalman, K., Tong, L. L., Ho, T. H., Gutman, G. A., Crocq, M. A., Ganguli, R., Nimgaonkar, V., Morris-Rosendahl, D. J., Gargus, J. J. (1998). Isolation of a novel potassium channel gene *h*SKCa3 containing a polymorphic CAG repeat: a candidate for schizophrenia and bipolar disorder? *Mol. Psychiatry* **3**, 32–37.

14. Chen, L., Wang, Z.-W., Zhu, J.-w., Zhan, X. (2006). Roles of cortactin, an actin polymerization mediator, in cell endocytosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **38**, 95–103.

15. Cohen, S. N., Chang, A. C., Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 2110–2114.

16. Curtain, R., Sundholm, J., Lea, R., Ovcaric, M., MacMillan, J., Griffiths, L. (2005). Association analysis of a highly polymorphic CAG Repeat in the human potassium channel gene KCNN3 and migraine susceptibility. *BMC Med. Genet.* **6**, 32.

17. Devor, D. C., Singh, A. K., Frizzell, R. A., Bridges, R. J. (1996). Modulation of Cl^- secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a Ca(2+)-dependent K^+ channel. *Am. J. Physiol.* **271**, L775-84.

18. Dror, V., Shamir, E., Ghanshani, S., Kimhi, R., Swartz, M., Barak, Y., Weizman, R., Avivi, L., Litmanovitch, T., Fantino, E., Kalman, K., Jones, E.

G., Chandy, K. G., Gargus, J. J., Gutman, G. A., Navon, R. (1999). *h*KCa3/KCNN3 potassium channel gene: association of longer CAG repeats with schizophrenia in Israeli Ashkenazi Jews, expression in human tissues and localization to chromosome 1q21. *Mol. Psychiatry* **4**, 254–260.

19. Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S. R., Rose, K., Camilli, P. de (2001). Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J. Cell Biol.* **155**, 193–200.

20. Figueroa, K. P., Chan, P., Schöls, L., Tanner, C., Riess, O., Perlman, S. L., Geschwind, D. H., Pulst, S. M. (2001). Association of moderate polyglutamine tract expansions in the slow calcium-activated potassium channel type 3 with ataxia. *Arch. Neurol.* **58**, 1649–1653.

21. Frei, E., Spindler, I., Grissmer, S., Jäger, H. (2006). Interactions of N-terminal and C-terminal parts of the small conductance Ca^{2+} activated K^+ channel, *h*SK3. *Cell. Physiol. Biochem.* **18**, 165–176.

22. Gad, H., Ringstad, N., Löw, P., Kjaerulff, O., Gustafsson, J., Wenk, M., Di Paolo, G., Nemoto, Y., Crun, J., Ellisman, M. H., Camilli, P. de, Shupliakov, O., Brodin, L. (2000). Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron* **27**, 301–312.

23. Gallop, J. L., Butler, P. J. G., McMahon, H. T. (2005). Endophilin and CtBP/BARS are not acyl transferases in endocytosis or Golgi fission. *Nature* **438**, 675–678.

24. Giachino, C., Lantelme, E., Lanzetti, L., Saccone, S., Bella Valle, G., Migone, N. (1997). A novel SH3-containing human gene family preferentially expressed in the central nervous system. *Genomics* **41**, 427–434.

25. Grissmer, S., Lewis, R. S., Cahalan, M. D. (1992). Ca^{2+}-activated K^+ channels in human leukemic T cells. *J. Gen. Physiol.* **99**, 63–84.

26. Grube, S., Gerchen, M. F., Adamcio, B., Pardo, L. A., Martin, S., Malzahn, D., Papiol, S., Begemann, M., Ribbe, K., Friedrichs, H., Radyushkin, K. A., Müller, M., Benseler, F., Riggert, J., Falkai, P., Bickeböller, H., Nave, K.-A., Brose, N., Stühmer, W., Ehrenreich, H. (2011). A CAG repeat polymorphism of KCNN3 predicts SK3 channel function and cognitive performance in schizophrenia. *EMBO Mol Med* **3**, 309–319.

27. Habermann, B. (2004). The BAR-domain family of proteins: a case of bending and binding? *EMBO Rep.* **5**, 250–255.

28. Herrmann, S., Ninkovic, M., Kohl, T., Lörinczi, É., Pardo, L. A. (2012). Cortactin controls surface expression of the voltage-gated potassium channel K(V)10.1. *J. Biol. Chem.* **287**, 44151–44163.

29. Hill, E., van der Kaay, J., Downes, C. P., Smythe, E. (2001). The role of dynamin and its binding partners in coated pit invagination and scission. *J. Cell Biol.* **152**, 309–323.

30. Hoffman, J. F., Joiner, W., Nehrke, K., Potapova, O., Foye, K., Wickrema, A. (2003). The *h*SK4 (KCNN4) isoform is the Ca^{2+}-activated K^{+} channel (Gardos channel) in human red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **100**, 7366–7371.

31. Hoppner, C. A., Spindler, I., Wälter, S., Wanker, E., Lehmann-Horn, F., Grissmer, S., Jäger, H. (2004) Protein interaction of *h*SK3 with a protein of the endophilin family *Biophys. J.* **86**, (suppl.) 288a (abstr.)

32. Hosseini, R., Benton, D. C., Dunn, P. M., Jenkinson, D. H., Moss, G. W). SK3 is an important component of *logy* **535**, 323–334.

33. Huttner, W. B., Schmidt, A. (2000). Lipids, lipid modification and lipid-protein interaction in membrane budding and fission--insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 543–551.

34. Ishii, T. M., Silvia, C., Hirschberg, B., Bond, C. T., Adelman, J. P., Maylie, J. (1997). A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 11651–11656.

35. Jäger, H., Adelman, J. P., Grissmer, S. (2000). SK2 encodes the apamin-sensitive Ca(2+)-activated K(+) channels in the human leukemic T cell line, Jurkat. *FEBS Lett.* **469**, 196–202.

36. Joiner, W. J., Wang, L. Y., Tang, M. D., Kaczmarek, L. K. (1997). hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 11013–11018.

37. Kleim, J. A., Freeman, J. H., Bruneau, R., Nolan, B. C., Cooper, N. R., Zook, A., Walters, D. (2002). Synapse formation is associated with memory storage in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 13228–13231.

38. Köhler, M., Hirschberg, B., Bond, C. T., Kinzie, J. M., Marrion, N. V., Maylie, J., Adelman, J. P. (1996). Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* **273**, 1709-1713.

39. Koronyo-Hamaoui, M., Danziger, Y., Frisch, A., Stein, D., Leor, S., Laufer, N., Carel, C., Fennig, S., Minoumi, M., Apter, A., Goldman, B., Barkai, G., Weizman, A., Gak, E. (2002). Association between anorexia nervosa and the *h*SKCa3 gene: a family-based and case control study. *Mol. Psychiatry* **7**, 82–85.

40. Koronyo-Hamaoui, M., Frisch, A., Stein, D., Denziger, Y., Leor, S., Michaelovsky, E., Laufer, N., Carel, C., Fennig, S., Mimouni, M., Ram, A., Zubery, E., Jeczmien, P., Apter, A., Weizman, A., Gak, E. (2007). Dual contribution of NR2B subunit of NMDA receptor and SK3 Ca(2+)-activated K^+ channel to genetic predisposition to anorexia nervosa. *J Psychiatr Res* **41**, 160–167.

41. Lancaster, B., Nicoll, R. A., Perkel, D. J. (1991). Calcium activates two types of potassium channels in rat hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* **11**, 23–30.

42. Lang, D. G., Ritchie, A. K. (1987). Large and small conductance calcium-activated potassium channels in the GH3 anterior pituitary cell line. *Pflügers Arch.* **410**, 614–622.

43. Li, T., Hu, X., Chandy, K. G., Fantino, E., Kalman, K., Gutman, G., Gargus, J. J., Freeman, B., Murray, R. M., Dawson, E., Liu, X., Bruinvels, A. T., Sham, P. C., Collier, D. A. (1998). Transmission disequilibrium analysis of a triplet repeat within the *h*SKCa3 gene using family trios with schizophrenia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 662–665.

44. Lua, B. L., Low, B. C. (2005). Cortactin phosphorylation as a switch for actin cytoskeletal network and cell dynamics control. *FEBS Lett.* **579**, 577–585.

45. Mandel, M., Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159–162.

46. Masuda, M., Takeda, S., Sone, M., Ohki, T., Mori, H., Kamioka, Y., Mochizuki, N. (2006). Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *EMBO J.* **25**, 2889–2897.

47. McCloskey, M. A., Cahalan, M. D. (1990). G protein control of potassium channel activity in a mast cell line. *J. Gen. Physiol.* **95**, 205–227.

48. McMahon, H. T., Gallop, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **438**, 590–596.

49. Messier, C., Mourre, C., Bontempi, B., Sif, J., Lazdunski, M., Destrade, C. (1991). Effect of apamin, a toxin that inhibits Ca(2+)-dependent K^+ channels, on learning and memory processes. *Brain Res.* **551**, 322–326.

50. Micheva, K. D., Ramjaun, A. R., Kay, B. K., McPherson, P. S. (1997). SH3 domain-dependent interactions of endophilin with amphiphysin. *FEBS Lett.* **414**, 308–312.

51. Modregger, J., Schmidt, A. A., Ritter, B., Huttner, W. B., Plomann, M. (2003). Characterization of Endophilin B1b, a brain-specific membrane-associated lysophosphatidic acid acyl transferase with properties distinct from endophilin A1. *J. Biol. Chem.* **278**, 4160–4167.

52. Mössner, R., Weichselbaum, A., Marziniak, M., Freitag, C. M., Lesch, K.-P., Sommer, C., Meyer, J. (2005). A highly polymorphic poly-glutamine stretch in the potassium channel KCNN3 in migraine. *Headache* **45**, 132–136.

53. Neher, E., Sakmann, B., Steinbach, J. H. (1978). The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch.* **375**, 219–228.

54. Neher, E., Sandblom, J., Eisenman, G. (1978b). Ionic selectivity, saturation, and block in gramicidin A channels. II. Saturation behavior of single channel conductances and evidence for the existence of multiple binding sites in the channel. *J. Membr. Biol.* **40**, 97–116.

55. Ngo-Anh, T. J., Bloodgood, B. L., Lin, M., Sabatini, B. L., Maylie, J., Adelman, J. P. (2005). SK channels and NMDA receptors form a Ca^{2+}-mediated feedback loop in dendritic spines. *Nat. Neurosci.* **8**, 642–649.

56. Pallotta, B. S., Magleby, K. L., Barrett, J. N. (1981). Single channel recordings of Ca^{2+}-activated K^+ currents in rat muscle cell culture. *Nature* **293**, 471–474.

57. Pardo, L. A., del Camino, D., Sánchez, A., Alves, F., Brüggemann, A., Beckh, S., Stühmer, W. (1999). Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J.* **18**, 5540–5547.

58. Park, Y. B. (1994). Ion selectivity and gating of small conductance Ca(2+)-activated K^+ channels in cultured rat adrenal chromaffin cells. *J. Physiol.* **481 (Pt 3)**, 555–570.

59. Pedarzani, P., Mosbacher, J., Rivard, A., Cingolani, L. A., Oliver, D., Stocker, M., Adelman, J. P., Fakler, B. (2001). Control of electrical activity in central neurons by modulating the gating of small conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels. *J. Biol. Chem.* **276**, 9762–9769.

60. Portzehl, H., Caldwell, P. C., Rueegg, J. C. (1964). The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the *Crab Maia Squinado* on the internal concentration of free calcium ions. *Biochim. Biophys. Acta* **79**, 581–591.

61. Renaud, J. F., Desnuelle, C., Schmid-Antomarchi, H., Hugues, M., Serratrice, G., Lazdunski, M. (1986). Expression of apamin receptor in muscles of patients with myotonic muscular dystrophy. *Nature* **319**, 678–680.

62. Reutens, A. T., Begley, C. G. (2002). Endophilin-1: a multifunctional protein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 1173–1177.

63. Rikhy, R., Kumar, V., Mittal, R., Krishnan, K. S. (2002). Endophilin is critically required for synapse formation and function in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* **22**, 7478–7484.

64. Ringstad, N., Gad, H., Löw, P., Di Paolo, G., Brodin, L., Shupliakov, O., Camilli, P. de (1999). Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* **24**, 143–154.

65. Ringstad, N., Nemoto, Y., Camilli, P. de (1997). The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 8569–8574.

66. Ringstad, N., Nemoto, Y., Camilli, P. de (2001). Differential expression of endophilin 1 and 2 dimers at central nervous system synapses. *J. Biol. Chem.* **276**, 40424–40430.

67. Sabatini, B. L., Oertner, T. G., Svoboda, K. (2002). The life cycle of Ca(2+) ions in dendritic spines. *Neuron* **33**, 439–452.

68. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual.* 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, Anhang C1, 10.27-10.37.

69. Sander, T., Schölz, L., Janz, D., Epplen, J. T., Riess, O. (1999). Length variation of a polyglutamine array in the gene encoding a small-conductance, calcium-activated potassium channel (*h*SKCa3) and susceptibility to idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res.* **33**, 227–233.

70. Scales, S. J., Scheller, R. H. (1999). Lipid membranes shape up. *Nature* **401**, 123–124.

71. Schlichter, L. C., Kaushal, V., Moxon-Emre, I., Sivagnanam, V., Vincent, C. (2010). The Ca^{2+} activated SK3 channel is expressed in microglia in the rat striatum and contributes to microglia-mediated neurotoxicity in vitro. *J. Neuroinflammation* **7**, 4.

72. Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikow, A., Witke, W., Huttner, W, Söling H.,(1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid, *Nature* **401**, 133 - 141

73. Schumacher, M. A., Rivard, A. F., Bächinger, H. P., Adelman, J. P. (2001). Structure of the gating domain of a Ca^{2+}-activated K^+ channel complexed with Ca^{2+}/calmodulin. *Nature* **410**, 1120–1124.

74. Schuuring, E., Verhoeven, E., Mooi, W. J., Michalides, R. J. (1992). Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. *Oncogene* **7**, 355–361.

75. Simpson, F., Hussain, N. K., Qualmann, B., Kelly, R. B., Kay, B. K., McPherson, P. S., Schmid, S. L. (1999). SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nat. Cell Biol.* **1**, 119–124.

76. Singh, S., Syme, C. A., Singh, A. K., Devor, D. C., Bridges, R. J. (2001). Benzimidazolone activators of chloride secretion: potential therapeutics for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 600–611.

77. Sittler, A., Wälter, S., Wedemeyer, N., Hasenbank, R., Scherzinger, E., Eickhoff, H., Bates, G. P., Lehrach, H., Wanker, E. E. (1998). SH3GL3 associates with the Huntingtin exon 1 protein and promotes the formation of polygln-containing protein aggregates. *Mol. Cell* **2**, 427–436.

78. Spindler, I., Wanker, E., Wälter, S., Chandy, K.,G., Grissmer, S., Jäger, H. (2003). Interaction of SH3GL3 with the cytoplasmic N-tail of the small Ca^{2+}-activated K^+ channel, *h*SK3 (KCNN3). *Biophys. J.* **84**, (suppl.) 236a.

79. Stackman, R. W., Hammond, R. S., Linardatos, E., Gerlach, A., Maylie, J., Adelman, J. P., Tzounopoulos, T. (2002). Small conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels modulate synaptic plasticity and memory encoding. *J. Neurosci.* **22**, 10163–10171.

80. Stocker, M., Pedarzani, P. (2000). Differential distribution of three Ca(2+)-activated K(+) channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* **15**, 476–493.

81. Sugiura, H., Iwata, K., Matsuoka, M., Hayashi, H., Takemiya, T., Yasuda, S., Ichikawa, M., Yamauchi, T., Mehlen, P., Haga, T., Yamagata, K. (2004). Inhibitory role of endophilin 3 in receptor-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 23343–23348.

82. Tuteja, D., Rafizadeh, S., Timofeyev, V., Wang, S., Zhang, Z., Li, N., Mateo, R. K., Singapuri, A., Young, J. N., Knowlton, A. A., Chiamvimonvat, N. (2010). Cardiac small conductance Ca^{2+}-activated K^+ channel subunits form heteromultimers via the coiled-coil domains in the C termini of the channels. *Circ. Res.* **107**, 851–859.

83. Ujike, H., Yamamoto, A., Tanaka, Y., Takehisa, Y., Takaki, M., Taked, T., Kodama, M., Kuroda, S. (2001). Association study of CAG repeats in the KCNN3 gene in Japanese patients with schizophrenia, schizoaffective disorder and bipolar disorder. *Psychiatry Res* **101**, 203–207.

84. Vijai, J., Kapoor, A., Ravishankar, H. M., Cherian, P. J., Kuruttukulam, G., Rajendran, B., Sridharan, R., Rangan, G., Girija, A. S., Jayalakshmi, S., Mohandas, S., Mani, K. S., Radhakrishnan, K., Anand, A. (2005). Protective and susceptibility effects of *h*SKCa3 allelic variants on juvenile myoclonic epilepsy. *J. Med. Genet.* **42**, 439–442.

85. Weed, S. A., Karginov, A. V., Schafer, D. A., Weaver, A. M., Kinley, A. W., Cooper, J. A., Parsons, J. T. (2000). Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *The Journal of Cell Biology* **151**, 29–40.

86. Wei, A. D., Gutman, G. A., Aldrich, R., Chandy, K. G., Grissmer, S., Wulff, H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 463–472.

87. Wissmann, R., Bildl, W., Neumann, H., Rivard, A. F., Klöcker, N., Weitz, D., Schulte, U., Adelman, J. P., Bentrop, D., Fakler, B. (2002). A helical region in the C terminus of small-conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels controls assembly with apo-calmodulin. *J. Biol. Chem.* **277**, 4558–4564.

88. Wittekindt, O. H., Visan, V., Tomita, H., Imtiaz, F., Gargus, J. J., Lehmann-Horn, F., Grissmer, S., Morris-Rosendahl, D. J. (2004). An apamin- and scyllatoxin-insensitive isoform of the human SK3 channel. *Mol. Pharmacol.* **65**, 788–801.

89. Wittekindt, O., Jauch, A., Burgert, E., Schärer, L., Holtgreve-Grez, H., Yvert, G., Imbert, G., Zimmer, J., Hoehe, M. R., Macher, J. P., Chiaroni, P., van Calker, D., Crocq, M. A., Morris-Rosendahl, D. J. (1998). The human small conductance calcium-regulated potassium channel gene (*h*SKCa3) contains two CAG repeats in exon 1, is on chromosome 1q21.3, and shows a possible association with schizophrenia. *Neurogenetics* **1**, 259–265.

90. Wolfart, J., Neuhoff, H., Franz, O., Roeper, J. (2001). Differential expression of the small-conductance, calcium-activated potassium channel SK3 is critical for pacemaker control in dopaminergic midbrain neurons. *J. Neurosci.* **21**, 3443–3456.

91. Wulff, H., Castle, N. A., Pardo, L. A. (2009). Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nature reviews. Drug discovery* **8**, 982–1001.

92. Xia, X. M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J. E., Ishii, T., Hirschberg, B., Bond, C. T., Lutsenko, S., Maylie, J., Adelman, J. P. (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* **395**, 503–507.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Stephan Grissmer für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen und für seine Unterstützung auch in den Zeiten in denen es nicht so gut voran ging. Dabei möchte ich seine freundliche Hilfe, seine produktive Diskussionsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre besonders hervorheben

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. Eva Frei sowie Frau Dr. Heike Jäger für ihre ausgezeichnete Betreuung und Anleitung, mein Einarbeiten in dieses Thema und ihre stetige Hilfestellung sowie die für mich sehr wichtigen Diskussionen.
Frau Dr. Zerrin Kuras, Frau Dr. Sylvia Prütting Herrn Dr. Ansel Hoppner danke ich für Ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.
Frau Katharina Ruff danke ich für ihre Hilfe bei molekularbiologischen Arbeiten.

Herrn PD Dr. Karl Föhr danke ich für die Begutachtung meiner Dissertation.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Stephan Grissmer möchte ich für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Atmosphäre in unserer Gruppe und für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft danken.

Schlussendlich bedanke ich mich bei allen anderen aus der Abteilung für Angewandte Physiologie, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

LEBENSLAUF

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung einer *h*SK3-α-Untereinheit---------- 4

Abb. 2: Die Sensitivität von DC-EBIO vs. 1-EBIO (Devor *et al.*, 1996) ---------- 8

Abb. 3: Schematische Darstellung eines Endophilin 3-Monomers. ---------- 10

Abb. 4: Phylogenetischer Baum der Endophilin-Familie (Habermann, 2004). --- 11

Abb. 5: Endogene Ströme durch *h*SK3 Kanäle in PC12 Zellen in Kontrollexperimenten. ---------- 24

Abb. 6: Endogene *h*SK3 Ströme in PC12 Zellen in Kontrollexpermenten in Anwesenheit von Cs^+-Lösung als externe Lösung. ---------- 26

Abb. 7: Endogene *h*SK3 Ströme in PC12 Zellen in Anwesenheit von Endophilin 3. ---------- 28

Abb. 8: Aktivierung endogener *h*SK3 Ströme in Gegenwart von DC-EBIO in Kontroll-PC12 Zellen. ---------- 31

Abb. 9: Dosis-Wirkungskurve für DC-EBIO, Ströme durch *h*SK3 Kanäle zu aktivieren. ---------- 32

Abb. 10: Endogene *h*SK3 Ströme in PC12 Zellen in Anwesenheit von Endophilin 3 und DC-EBIO.---------- 34

Abb. 11: Endogene *h*SK3 Ströme in PC12 Zellen in Anwesenheit von Endophilin 3 und DC-EBIO.---------- 36

Abb. 12: Bestimmung der EC_{50} und des Hill-Koeffizienten für DC-EBIO in Anwesenheit von der Interakiton von Endophilin 3 mit *h*SK3. ---------- 38

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Bezeichnungen der Endophiline und Accessionnummern 10

Tab. 2: Zusammensetzung der extrazellulären Badlösungen (mM). 18

Tab. 3: Tabellarische Darstellung der Mittelwerte der gemessenen Ganzzellströme bei – 80 mV in pA in PC12 Zellen. 33