

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie
und Pharmazie der Ludwigs-Maximilians-Universität München

Neue Methoden für die
elektrophysiologische Untersuchung
prokaryotischer und mitochondrialer
Ionentransportsysteme



Maria Barthmes, geb. Staude
aus Ingolstadt

2015

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Professor Wahl-Schott betreut.

Eidesstattliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München,,

.....

Dissertation eingereicht am 03.03.2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Wahl-Schott

2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel

Mündliche Prüfung am 18.05.2015

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Ionentransport in biologischen Systemen	1
1.2 Elektrophysiologie prokaryotischer Membranen	4
1.2.1 Der Natrium-Calcium-Transporter NCX	5
1.2.2 Mechanosensitive Ionenkanäle	6
1.3 Elektrophysiologie mitochondrialer Membranen	7
1.3.1 Ionenleitfähigkeiten der inneren mitochondrialen Membran	8
1.3.2 MitoBK _{Ca}	9
1.4 Stand der Technik in der Elektrophysiologie	12
1.4.1 Patch Clamp Technik	12
1.4.2 Künstliche Lipidmembranen	15
1.4.3 Festkörpergestützte Membranen	17
1.4.4 Elektrophysiologische Techniken für Mitochondrien	22
1.4.5 Elektrophysiologische Techniken für Bakterien	24
1.5 Ziele dieser Arbeit	26
2 Methoden	29
2.1 Präparation kardialer Mitoplasten	29
2.1.1 Isolation kardialer Myocyten aus Mäuseherzen	29
2.1.2 Mitoplasten Präparation	30
2.2 Präparation von Sphäroplasten	31
2.3 Isolation von Zellmembranen	32

2.4	Heterogene Expression und Isolation von Proteinen	32
2.5	Herstellung von Lipidvesikeln	34
2.6	Proteinrekonstitution in Lipidvesikeln	37
2.7	Erzeugung von Bilayern aus GUVs	37
2.8	Patch Clamp Methodiken	38
2.8.1	Mitoplasten Patch Clamp	38
2.8.2	Patch Clamp Methodik für Sphäroplasten	42
2.8.3	Aktivierung mechanosensitiver Ionenkanäle	43
2.9	SSM Sensorpräparation	46
2.10	SSM basierte elektrophysiologische Messungen	46
2.11	Datenauswertung	50
3	Ergebnisse	53
3.1	Identifikation von mitoBK _{Ca}	53
3.1.1	Patch Clamp Technik für die innere mitochondriale Membran	53
3.1.2	Patch Clamp Technik für die äußere mitochondriale Membran	57
3.1.3	Identifizierung von mitoBK _{Ca}	57
3.2	Bakterielle mechanosensitive Ionenkanäle	63
3.2.1	McsL in künstlichen Bilayermembranen	63
3.2.2	Endogene Ionenströme in Sphäroplasten	66
3.2.3	Mechanosensitive Ionenströme in Sphäroplasten	69
3.3	Charakterisierung von NCX _{Mj}	72
3.3.1	Etablierung der Methode	72
3.3.2	Charakterisierung von NCX _{Mj}	76
4	Diskussion	83
4.1	MitoBK _{Ca} in Mitoplasten	83
4.2	MscL in Bilayern und Sphäroplasten	87
4.3	NCX in festkörpergestützten Membranen	91

5	Zusammenfassung	95
6	Literaturverzeichnis	97
7	Publikationen	111
8	Danksagung	113

Abbildungsverzeichnis

1.1	Ionentransportsysteme	2
1.2	Membransysteme	4
1.3	Struktur von NCX_Mj	6
1.4	Übersicht über die bekannten Ionenkanäle und Transporter der IMM	8
1.5	Vorgänge während Ischämie und folgender Reperfusion im Herzen	11
1.6	Konventionelle und planare Patch Clamp Technik	14
1.7	Methoden zur Herstellung von künstlichen Lipidschichten	16
1.8	Prinzip der SSM basierte Elektrophysiologie	21
1.9	Mitochondrien und Mitoplasten	23
1.10	Schematische Darstellung der Erzeugung von Sphäroplasten	25
2.1	Herstellung von GUVs durch Elektroformation	36
2.2	Planares Patch Clamp System „Port-a-Patch“	40
2.3	Automatische Patch Clamp Pumpe Suction Control Pro	44
2.4	Computergesteuerte Druckregulation	45
2.5	Hardware SURFE2R N1	47
2.6	Bestimmung von Kapazität und Leitfähigkeit der SSM	48
3.1	Charakteristische Ströme in Mitoplasten aus HEK293 Zellen	55
3.2	Chloridströme in HEK293 Mitoplasten	55
3.3	Mitoplastenpräparation aus murinen Kardiomyocyten, Konfokalaufnahme	56
3.4	Typische Aktivitäten in OMM	58
3.5	Einzelkanalleitfähigkeiten in Mitoplasten	60

3.6	Statistische Analyse der Auftrittswahrscheinlichkeit der vier identifizierten Leitfähigkeiten in Mitoplasten	61
3.7	Detailanalyse der Einzelkanalcharakteristika von mitoBK _{Ca}	62
3.8	Typische Aktivität von MscL, gemessen in einem künstlichen Bilayer auf einem planaren Patch Clamp	64
3.9	MscL in Bilayern, gemessen auf einem planaren Patch Clamp System	65
3.10	MscL in Liposomen, gemessen an einem konventionellen Patch Clamp Aufbau	66
3.11	Präparation von Sphäroplasten aus <i>E. coli</i>	68
3.12	Endogene Ionenströme in Sphäroplasten	69
3.13	Kanalaktivität in einem Sphäroplasten bei unterschiedlichem Druck	70
3.14	Charakteristik von nativem MscS	70
3.15	MscL in Sphäroplasten aus <i>E. coli</i>	71
3.16	MscL Aktivität in Sphäroplasten, gemessen an einem konventionellen Patch Clamp System	72
3.17	SSM basierter NCX_Mj Assay in Liposomen, Calcium dient als Aktivator	74
3.18	SSM basierter NCX_Mj Assay in Liposomen, Natrium dient als Aktivator	74
3.19	Effizienz und Reproduzierbarkeit der Methode	75
3.20	Calcium und Natrium Affinität von NCX_Mj im Vergleich mit NCX1	77
3.21	Anstieg der Amplitude von I _{Na/Ca}	78
3.22	Inhibition von NCX_Mj durch divalente Kationen	79
3.23	Selektivität von NCX_Mj bei hohen Konzentrationen	80
3.24	Selektivität von NCX_Mj bei niedrigen Konzentrationen	81
3.25	Alternative Substrate	82

Abkürzungsverzeichnis

AAT	ATP/ADP-Translokase
ABC	ATP-binding-cassette
ATP	Adenosintriphosphat
BLM	Black Lipid Membrane
DPHPC	1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
GUV	Giant Unilamellar Vesicle
HEK	Humam Embryonic Kidney Cell
hERG	Humam Ether-a-go-go-Related Gene, $K_v11.1$
IMAC	Inner Mitochondrial Anion Conductance
IMM	Inner Mitochondrial Membrane, innere mitochondriale Membran
IP	Ischämische Prækonditionierung
IR	Ischämie-Reperfusion
ITO	Indium-Zinn-Oxid
K_{ATP}	Mitochondrialer ATP-sensitiver Kaliumkanal
$K_v1.3$	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal 1.3
LB	Luria-Bertani Medium
MCU	Mitochondrialer Calcium Uniporter
mitoBK _{Ca}	Mitochondrialer Calcium-sensitiver Kaliumkanal, auch mK _{Ca} 1.1
MmaK	Prokaryotischer Nucleotid-gesteuerter Kaliumkanal
mPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
MSA	Methansolfonsäure

Abkürzungsverzeichnis

MscL	Prokaryotischer, mechanosensitiver Kanal mit großer Leitfähigkeit
MscS	Prokaryotischer, mechanosensitiver Kanal mit kleiner Leitfähigkeit
MthK	Calcium-gesteuerter prokaryotischer Kaliumkanal
NCX	Natrium-Calcium-Exchanger
OMM	Outer Mitochondrial Membrane, äußere mitochondriale Membran
SAM	Self-assembling Monolayer
Slo2.2	auch $K_{Ca4.1}$, SLACK, Calcium-sensitiver Kaliumkanal
SSM	Solid Supported Membrane
SURFE2R	Surface Electrogenic Event Reader
VDAC	Voltage Dependent Anion Conductance

1 Einleitung

1.1 Ionentransport in biologischen Systemen

Der Transport von Ionen über die biologischen Membransysteme der Zelle ist von fundamentaler Bedeutung für die Lebensfähigkeit jedes Organismus. Die Ionenleitfähigkeiten der Membranen, sowie deren exakte Regelung, machen nicht nur die elektrische Erregbarkeit von Nerven- und Muskelzellen möglich, sie erlauben auch die Kontrolle des inneren Milieus der Zelle und spielen eine zentrale Rolle für den Stofftransport und die Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen (Yu und Catterall, 2004).

Biomembranen bestehen aus einer Phospholipid-Doppelschicht, die für Ionen unpermeabel ist. Dennoch besitzen Biomembranen die Fähigkeit, Ionen auf streng geregelte Weise zu leiten. Dies wird durch spezielle Transmembranproteine möglich. Es handelt sich dabei um Ionenkanäle, -pumpen und -transporter (Carrier). Die Aktivität von Ionenkanälen wird durch das Membranpotential oder durch die Bindung von Liganden gesteuert. Spezifische Ionen können, angetrieben von ihrem elektrochemischen Gradienten, passiv hindurchströmen. Ionentransporter und -pumpen können eine spezifische Ionen- oder Molekülspezies auch gegen ihren elektrochemischen Gradienten über die Membran transportieren. Die Energie dazu stammt entweder aus der Hydrolyse von ATP oder dem Cotransport weiterer Ionen oder Moleküle, deren elektrochemischer Gradient den thermodynamisch ungünstigen Transport des Hauptsubstrats kompensiert (Abb. 1.1).

Ionentransportsysteme haben eine hohe pathologische Relevanz. Funktions-

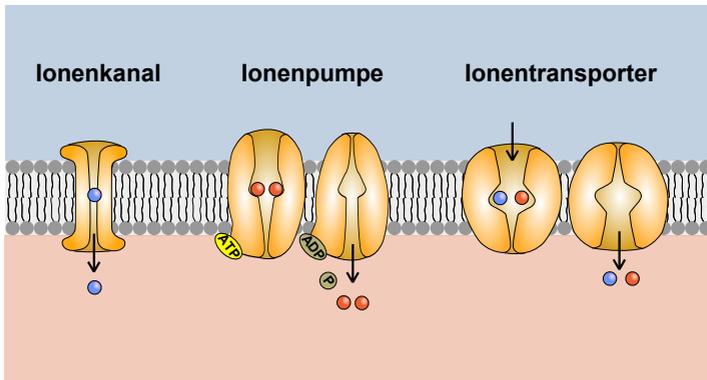


Abbildung 1.1: Ionentransportsysteme. Ionenkanäle bilden eine selektive Pore, die Ionen bewegen sich in Richtung des elektrochemischen Gradienten. Ionen-transporter (Carrier) und Pumpen können ihre Substrate auch gegen deren elektrochemischen Gradienten bewegen. Die dafür benötigte Energie beziehen Pumpen aus dem Abbau von ATP, Transporter aus dem Cotransport weiterer Substrate.

störungen von Ionenkanälen führen zu sogenannten Ionenkanalerkrankungen. Oft werden sie durch Mutationen in der kodierenden Gensequenz verursacht. Sie äußern sich klinisch sehr heterogen, beispielsweise als hereditäre Skelettmuskelerkrankungen (Cannon, 2006), Epilepsien (Catterall u. a., 2008), bestimmte Formen der Migräne (Pietrobon und Striessnig, 2003), genetischen Formen der Blindheit (Biel und Michalakakis, 2007) und potentiell lebensbedrohliche Arrhythmien (Lehnart u. a., 2007). Ebenso werden Fehlfunktionen von Transportern mit einer Vielzahl von Krankheiten in Verbindung gebracht. Dazu zählen beispielsweise Gicht (Zhang u. a., 2014), neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson (Nutt u. a., 2004) oder entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Borst und Elferink, 2002). Die pathologische Bedeutung und Vielfalt der Ionen-transportersysteme machen sie zu potenten Angriffspunkten für viele Pharmaka. Jedoch entstehen auch unerwünschte Medikamentenwechselwirkungen mit bisweilen schwerwiegenden Folgen. So wurden beispielsweise durch einige

Antihistaminika schwere Arrhythmien verursacht, weil sie unbeabsichtigt den Kaliumkanal hERG (human Ether-a-go-go-Related Gene, K_v11.1) inhibierten (Sanguinetti und Tristani-Firouzi, 2006).

Die Vielzahl an unterschiedlichen Ionenkanälen und -transportern ist enorm. Mindestens 230 Ionenkanäle wurden allein im humanen Genom identifiziert (Jegla u. a., 2009; Alexander u. a., 2013b,a). Sie werden nach ihrer Sequenzhomologie und Funktionalität eingeteilt. Ionentransporter werden unterteilt in die Hauptklassen ABC-Transporter (ATP-binding-cassette), ATPasen und die SLC (Solute Carrier) Superfamilie. Allein die Superfamilie der SLC-Transporter, von denen viele Ionen oder geladene Moleküle transportieren, umfasst 48 identifizierte Familien mit jeweils bis zu 20 Mitgliedern (Alexander u. a., 2013c). Die bekannten Ionenkanäle und Transporter befinden sich nicht nur in der eukaryotischen Plasmamembran, sondern auch in intrazellulären Membranen, wie sie Mitochondrien, Lysosomen, Endoplasmatisches Retikulum, Golgi Apparat und Zellkern besitzen. Diese Gruppe der intrazellulären Ionenkanäle ist nach aktuellem Wissen ähnlich groß wie die der plasmamembranständigen. Eine weitere große und heterogene Gruppe bilden die Ionentransportsysteme aus prokaryotischen Membranen.

Über die Ionentransportsysteme aus den schwer zugänglichen intrazellulären und prokaryotischen Membranen ist viel weniger bekannt als über die Kanäle und Transporter der eukaryotischen Plasmamembran. Sie gewinnen zunehmend das Interesse der Grundlagen- und Pharmaforschung. Die Untersuchung dieser Ionentransportsysteme bereitet jedoch oft Schwierigkeiten, da viele etablierte Methoden für diese speziellen Fälle nicht geeignet sind. Mit dieser Problematik soll sich die vorliegende Arbeit beschäftigen, wobei der Fokus auf Ionentransportsystemen aus prokaryotischer und der damit verwandten inneren mitochondrialen Membran liegt (Abb. 1.2).

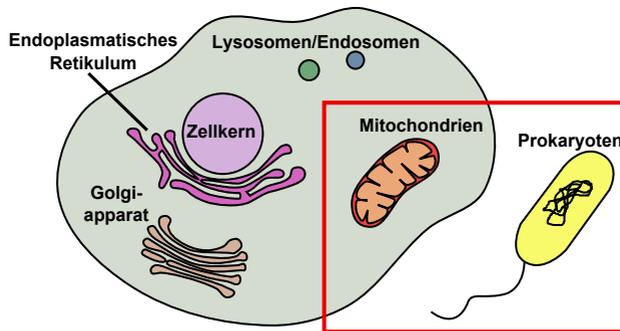


Abbildung 1.2: Übersicht über eukaryotische und prokaryotische Membransysteme. Biomembranen umschließen die eukaryotische Zelle selbst, den Zellkern, Endoplasmatisches Retikulum, Golgi Apparat sowie Endo- und Lysosomen. Mitochondrien besitzen eine Doppelmembran. Bakterienzellen besitzen je nach Art ein oder zwei Membranen. Die in dieser Arbeit behandelten Membranen sind rot eingefasst.

1.2 Elektrophysiologie prokaryotischer Membranen

Die prokaryotische Plasmamembran gleicht im Aufbau den Membranen höherer Organismen, zeigt jedoch eine andere Lipidzusammensetzung. Vorkommen und Verhältnis verschiedener Phospholipide variieren, jedoch ist das Auftreten von Cardiolipin immer charakteristisch (Remaut und Fronzes, 2014). Cardiolipine sind Diphosphatidylglycerine, die in der eukaryotischen Plasmamembran nicht auftreten. Eine weitere Besonderheit prokaryotischer Membranen ist der hohe Proteinanteil von ca. 75% (Alberts u. a., 2011).

Die in die Membran eingelagerten prokaryotischen Ionentransportsysteme sind für die molekulare Strukturaufklärung von besonderem Interesse. Da sie relativ einfach in großer Menge gewonnen werden können, eignen sie sich hervorragend zur Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse. Es war daher

ein bakterieller Ionenkanal, der Kaliumkanal KcsA, dessen Struktur erstmals aufgeklärt werden konnte (Doyle u. a., 1998). Die Strukturaufklärung bakterieller Ionentransportproteine ist ein sehr wichtiges Werkzeug geworden, um Informationen über homologe eukaryotische Proteine zu gewinnen (Koprowski und Kubalski, 2001).

1.2.1 Der Natrium-Calcium-Transporter NCX

Bis heute gelang es nur in zwei Fällen, Kristallstrukturen von humanen Transportern (Glut1, RhCG) zu erzeugen (Deng u. a., 2014; Gruswitz u. a., 2010). Deshalb wurde für die Untersuchung der Struktur des Natrium-Calcium-Austauschers (NCX) eine strukturell ähnliche prokaryotischen Isoform aus dem Archaeon *Methanococcus jannaschii* gewählt (NCX_Mj). Die Kristallstruktur und ein möglicher Transportmechanismus dieses prokaryotischen Transporters wurden kürzlich von Liao u. a. (2012) veröffentlicht (Abb. 1.3). Obwohl die Funktion des humanen NCX schon seit langem untersucht wird, war über Struktur und Transportmechanismus bis dahin wenig bekannt.

NCX ist ein elektrogener Ionentransporter, der in verschiedenen Isoformen in nahezu allen Organismen vorkommt (Blaustein und Lederer, 1999). Abhängig vom Membranpotential transportiert NCX ein Calciumion aus oder in die Zelle, wobei gleichzeitig drei Natriumionen in die Gegenrichtung befördert werden. Bei höheren Organismen spielt NCX eine wesentliche Rolle bei der Homöostase des intrazellulären Calciumgehaltes. Viele physiologische Funktionen, wie Neurotransmitterfreigabe, Muskelkontraktion und Apoptose, werden sehr sensitiv durch Calciumsignale gesteuert. Der Calciumgehalt des Zelllumens wird daher durch redundante Mechanismen streng geregelt. Dazu tragen Natrium-Calcium-Austauscher bei, indem sie bei erhöhter intrazellulärer Calciumkonzentration dieses mit hoher Transportrate aus der

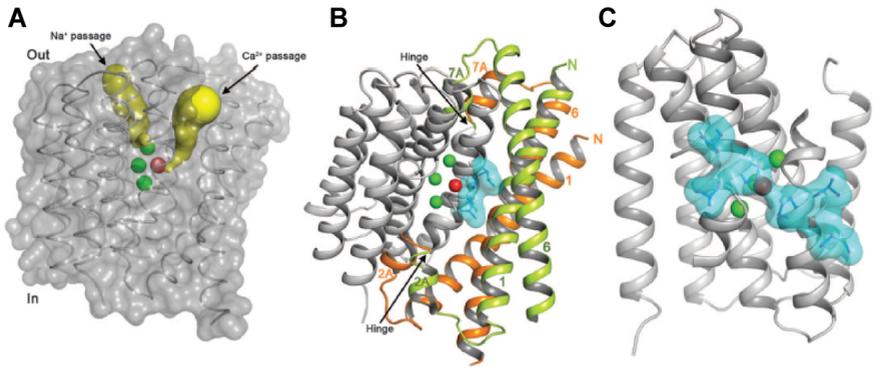


Abbildung 1.3: Struktur von NCX_Mj. A: Oberflächenansicht des NCX_Mj Modells. In Gelb sind die zwei unabhängigen Passagen für Natrium und Calcium markiert. B: Konformationsänderung des Transporters. In Grün ist die nach innen gerichtete Konformation, in orange die nach außen gerichtete dargestellt. Graue Teile bleiben unverändert. C: Der zentrale hydrophobe Bereich mit den Ionenbindungsstellen. Abbildung aus Liao u. a. (2012).

Zelle befördern (Sharma und O’Halloran, 2014). Beim Menschen kommen drei Subtypen von NCX vor (NCX1-3), die in Herz- und Skelettmuskulatur, sowie im Gehirn hoch exprimiert sind (Khananshvili, 2013). Sie haben eine hohe physiologische Relevanz, beispielsweise beeinflussen sie die Kontraktilität des Herzens (Ottolia u. a., 2013). Fehlfunktionen von NCX werden in Verbindung gebracht mit Arrhythmien (Khananshvili, 2013) und cerebraler Ischämie (Pignataro u. a., 2004).

1.2.2 Mechanosensitive Ionenkanäle

Eine Untergruppe der bakteriellen Ionenkanäle bilden die mechanosensitiven Kanäle. Mit den endogenen bakteriellen Kanälen MscL (mechanosensitive channel of large conductance) und MscS (mechanosensitive channel of small

conductance) wurden erstmals Ionenkanäle entdeckt, die durch mechanische Kraft- oder Spannungseinwirkung auf die Membran aktiviert werden (Martinac u. a., 1987). Diese bakteriellen mechanosensitiven Kanäle befinden sich in der Plasmamembran von Bakterienzellen und schützen sie vor Schädigungen, die in Folge eines hypoosmotischen Schocks auftreten können (Kung u. a., 2010). Unter solchen Bedingungen dringt Wasser in die Zelle ein, der Zellinnendruck und daraufhin auch die Membranspannung erhöhen sich. Bevor dies zur Lyse der Zelle führt, wird die erhöhte Membranspannung von mechanosensitiven Ionenkanälen registriert, welche infolgedessen Poren öffnen, durch die Ionen und sogar kleine Moleküle aus der Zelle strömen können, um das osmotische Potential wieder zu normalisieren.

Auch in eukaryotischen Zellen kommen ähnliche Kanäle vor. Diese eukaryotischen mechanosensitiven Ionenkanäle sind die molekulare Schnittstelle aller Zellen zu mechanischer Kraftübertragung. Sie sind in viele physiologische Prozesse involviert, wie zum Beispiel die Regulation des Blutdrucks oder Sinneswahrnehmungen wie Tasten und Hören (Martinac, 2007).

1.3 Elektrophysiologie mitochondrialer Membranen

Man geht davon aus, dass Mitochondrien aus eigenständigen frühen prokaryotischen Zellen entstanden sind, welche von eukaryotischen Vorläuferorganismen aufgenommen wurden. Sie verblieben permanent in der Wirtszelle und wurden so zu Endosymbionten. Durch die Endocytose erhielten sie ein Doppelmembransystem, wobei die innere Membran der ursprünglichen prokaryotischen und die äußere der Wirtsmembran entspricht. Die innere mito-

chondriale Membran zeigt deutlich ihre Verwandtschaft zur bakteriellen Plasmamembran. Wie diese besitzt sie einen sehr hohen Proteinanteil (Protein-Lipid-Verhältnis 4:1). Auch ähnelt ihre Lipidzusammensetzung bakteriellen Membranen, insbesondere das Auftreten von Cardiolipin ist charakteristisch (Scheffler, 2001).

1.3.1 Ionenleitfähigkeiten der inneren mitochondrialen Membran

Die beiden Membranen des Organells unterscheiden sich stark in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften. Während die äußere Membran (OMM, outer mitochondrial membrane) für kleine Moleküle und Ionen aufgrund großer Poren durchlässig ist, zeigt die innere Membran (IMM, inner mitochondrial membrane) selektive Ionenleitfähigkeiten, analog zur Plasmamembran.

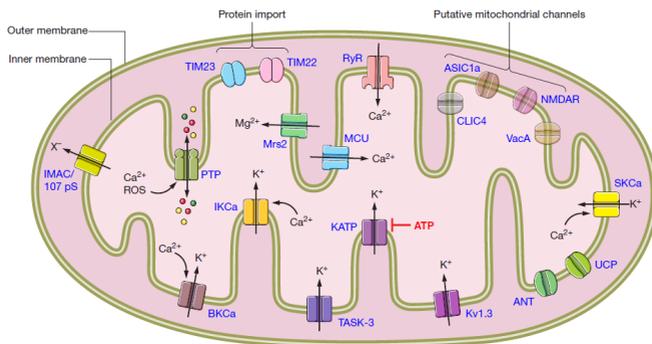


Abbildung 1.4: Übersicht über die bekannten Ionenkanäle und Transporter der inneren mitochondrialen Membran. Beschriebene Kaliumkanäle sind mitoBK_{Ca}, K_{ATP} und K_v1.3. (Szabo und Zoratti, 2014).

Die Zahl der in der IMM identifizierten Ionenleitfähigkeiten steigt bis heute.

Einige der beschriebenen Ionenleitfähigkeiten der IMM sind spezifisch für die IMM, wie zum Beispiel die protonentransportierenden Enzymkomplexe der Atmungskette oder der Anionenkanal IMAC (inner mitochondrial anion conductance) (O'Rourke u. a., 2005), andere kommen auch in der Plasmamembran vor. Neben IMAC wurden zwei Calciumkanäle (ein Rhyonodinrezeptor (Ryr) und der mitochondriale Calcium-Uniporter MCU) und drei Kaliumkanäle (K_{ATP} , $K_v1.3$, mitoBK_{Ca}) entdeckt, weitere werden vermutet (Szabo und Zoratti, 2014) (Abb. 1.4). Über die Funktion der mitochondrialen Ionenkanäle ist noch wenig bekannt.

1.3.2 MitoBK_{Ca}

Von den drei Kaliumkanälen soll der calcium- und spannungssensitive Kaliumkanal mitoBK_{Ca} hier genauer betrachtet werden. Ein analoger Kaliumkanal, BK_{Ca} (auch MaxiK, Slo1 oder KCa1.1), ist ubiquitär in der Plasmamembran, insbesondere erregbarer Zellen, exprimiert. Seine Bezeichnung (B für „big conductance“) rührt von der charakteristischen hohen Leitfähigkeit von 100 bis 300 pS her. Das Protein hat eine Masse von 125 kDa, jedoch sind einige alternative Splicing-Varianten bekannt (Szabo und Zoratti, 2014). Der Kanal wird durch erhöhten intrazellulären Calciumgehalt sowie Membrandepolarisation aktiviert. BK_{Ca} ist in die Regulation wichtiger physiologischer Prozesse involviert, darunter der Tonus der glatten Muskulatur und neuronale Erregbarkeit. Es wurde versucht, den Kanal für die Behandlung von Schlaganfällen pharmakologisch zu nutzen. Dazu wurden während akuter ischämischer Zustände BK_{Ca} Aktivatoren eingesetzt, die in den neuronalen Zellen eine erhöhte Kaliumleitfähigkeit erzeugen sollten. Diese sollte die Repolarisation der Zellen unterstützen und so einen toxischen Anstieg der Calciumkonzentration verhindern. Auf diese Weise sollte die Infarktgröße nach einer ischämischen Phase minimiert werden. Es konnte jedoch keine signifikante Wirksamkeit

nachgewiesen werden (Triggle u. a., 2006).

Eine mitochondriale Isoform des Kanals wurde erstmals in humanen Gliomazellen (Siemen u. a., 1999) entdeckt, später auch in der inneren mitochondrialen Membran von Maus-Kardiomyozyten (Ko u. a., 2009). Es gibt mehrere Ansätze zur Aufklärung der molekularen Identität von mito-BK_{Ca}. Verschiedene Studien beschreiben Proteine mit widersprüchlichen Größen (55, 80, 120 und 125 kDa), die als mitoBK_{Ca} identifiziert wurden (Szabo und Zoratti, 2014). Auch ist nicht gesichert, ob die mitochondriale Form durch das Gen KCNMA1 codiert wird, wie die Variante aus der Plasmamembran. Aktuell verdichten sich die Hinweise, dass mitoBK_{Ca} eine alternative Splicing-Variante des Gens ist, jedoch gibt es auch Hypothesen, dass mitoBK_{Ca} mit dem Gen für Slo2, einem verwandten Protein, verknüpft sein könnte (Szabo und Zoratti, 2014). Detaillierte elektrophysiologische Daten gibt es bisher nicht. Die ausführlichste Studie wurde von Siemen u. a. (1999) an kultivierten Gliomazellen durchgeführt, hier zeigte der Kanal ähnliche Eigenschaften wie die Plasmamembran-Variante. Ein ähnlicher Kanal wurde von Xu u. a. (2002) in mitochondrialer Membran aus dem Herzen beschrieben, wobei auch einige repräsentative Patch Clamp Daten veröffentlicht wurden.

Zur physiologischen Funktion von mitoBK_{Ca} gibt es einige Hinweise. Es wird diskutiert, ob der Kanal, zusammen mit K_{ATP}, dem neuronalen und kardialen Zellschutz bei Ischämie-Reperfusionen-Ereignissen (IR) dient (Abb. 1.5 A). Danach soll mitoBK_{Ca} unter speziellen pathologischen Bedingungen, die einen gesteigerten Calciumeinstrom in die mitochondriale Matrix hervorrufen (z.B. bei Ischämie), aktiv werden. Der dadurch hervorgerufene Kaliumstrom depolarisiert das hohe mitochondriale Membranpotential $\Delta\psi$, wodurch die Triebkraft des Calciumeinstroms sinkt, was eine mitochondriale Calciumüberladung verhindern soll (Abb. 1.5 B). Die mitochondriale Calciumüberladung gilt als ein potentieller Auslöser des Zelltods durch gesteigerte

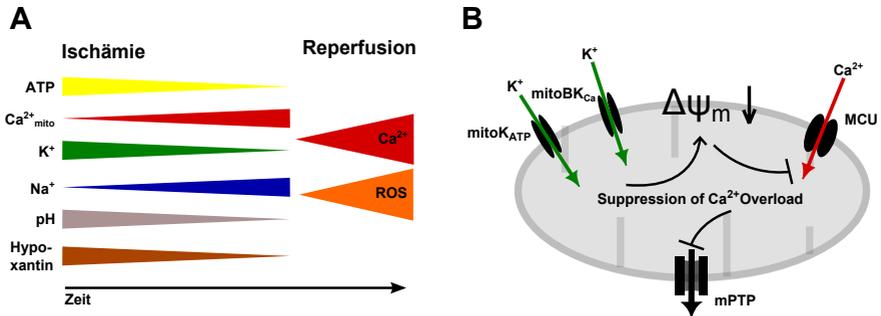


Abbildung 1.5: A: Vorgänge während Ischämie und folgender Reperfusion im Herzen. Während der ischämischen Phase wird innerhalb weniger Minuten das zelluläre ATP abgebaut. Dies führt zu einem Funktions-/stopp von ATP-abhängigen Ionentransportern, der Kaliumgehalt der Zelle sinkt, der Natriumgehalt steigt. Es kommt zu einem Anstieg der Calciumkonzentration in der Zelle und den Mitochondrien. Bei Einsetzen der Reperfusion geschieht eine plötzliche Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und das zellinterne Calcium steigt nochmal stark an. Wenn sich dieser Zustand nicht wieder normalisiert, können Arrhythmien bis hin zum Herztod oder Nekrosen entstehen. O'Rourke u. a. (2005). B: Hypothetischer Mechanismus des Zellschutz durch mitochondriale Kaliumkanäle. Der Kaliumstrom verringert durch Depolarisation den Calciumeinstrom in die Mitochondrien. Mit einer Calciumüberladung der Mitochondrien wird auch die Bildung von mPTP und der folgende Zelltod verhindert. Nach Nishida u. a. (2010)

Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der Ausbildung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transition-Pore (mPTP). (Sato u. a., 2005; Xu u. a., 2002; Nishida u. a., 2010).

MitoBK_{Ca} wird auch eine Rolle bei der ischämischen Präkonditionierung (IP) zugeschrieben. Kurze ischämische Phasen vor einem längeren ischämischen Ereignis machen das Herz weniger anfällig für dadurch hervorgerufene Gewebeschäden, die Infarktgröße sinkt. Dem Schutzeffekt liegen wohl viele Faktoren zugrunde, aber einer davon ist wahrscheinlich die Regulierung der Aktivität der mitochondrialen Kaliumkanäle (Yellon und Downey, 2003). Ein

Hinweis darauf ist, dass verschiedene Wirkstoffe, die die Funktionalität der Kaliumkanäle verändern, zum Beispiel BK_{Ca} -aktivierende Stoffe (Wang u. a., 2004), einen ähnlichen Effekt erzeugen wie ischämische Präkonditionierung (Murry u. a., 1986; Downey u. a., 2007). Es besteht großes Interesse, den Mechanismus der Präkonditionierung des Herzens besser zu verstehen, um ihn klinisch nutzbar zu machen. Zum Beispiel die präventive Behandlung von Infarkt-Risikopatienten wäre von sehr hohem Wert.

1.4 Stand der Technik in der Elektrophysiologie

Geeignete und effiziente Technologien zur Erforschung der Physiologie und der chemischen Wechselwirkungen von Ionenkanälen und -transportern haben nicht nur für die Grundlagenforschung, sondern auch für die pharmakologische Forschung und Entwicklung höchste Relevanz. Denn der Fortschritt in diesen Forschungsbereichen hängt stark von den zur Verfügung stehenden Technologien ab. Die kontinuierliche Verfeinerung, Erweiterung und Neuentwicklung von Methodiken ist nötig um viele noch offene Fragestellungen beantworten zu können. Insbesondere betrifft dies die Arbeit mit Ionentransportsystemen in schwer zugänglichen Membranen, wie die von intrazellulären Organellen und prokaryotischen Organismen.

1.4.1 Patch Clamp Technik

Aufbauend auf der zwei-Elektroden Voltage-Clamp Technik verhalfen Erwin Neher und Bert Sackmann 1976 mit der Entwicklung der Patch Clamp Technik der Ionenkanalforschung zum Durchbruch. Es wurde möglich, die Ionenströme individueller Kanalproteine zu beobachten, bis hin zu Amplituden

von wenigen Picoampere (Neher und Sackmann, 1976). Grundlage der Patch Clamp Technik ist der sogenannte Gigaseal – eine hochohmige ($>1G\Omega$) Verbindung, die eine mit Salzlösung gefüllte Borosilikatglas-Pipette unter den richtigen Voraussetzungen mit der Zellmembran ausbilden kann. Diese elektrisch dichte Verbindung ermöglicht, bei Verwendung geeigneter, hochempfindlicher Verstärker, die Ableitung der Ionenströme innerhalb eines wenige Mikrometer großen isolierten Membranflecks, oder der gesamten Membran einer Zelle. Mit dieser Technologie wurde es möglich, einzelne Kanalproteine zu identifizieren und ihre elektrophysiologischen Eigenschaften zu bestimmen. (Sackmann und Neher, 2009)

Ein Patch Clamp Setup besteht aus Mikromanipulator mit Halterung zur Pipetten-Positionierung und einem Mikroskop, die auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert sind. Zusätzlich muss sich der gesamte Aufbau zum Schutz vor elektrischen Einstreuungen in einem Faraday-Käfig befinden. Der Stromkreis zur Messung der Ionenströme über die Membran wird mithilfe zweier Elektroden gebildet, wobei sich die Mess- und Kommandoelektrode innerhalb der Pipette befindet. Elementarer Bestandteil ist ein spezieller Patch Clamp Verstärker, der üblicherweise eine Kommandospannung konstant hält und die so hervorgerufenen Ströme registriert.

Die planare Patch Clamp Konfiguration stellt eine Variation der beschriebenen klassischen Methode mit dem Ziel der Vereinfachung dar. Dabei wird die Pipette durch einen flachen Glaschip mit einer runden Apertur von ca. einem Mikrometer Durchmesser ersetzt (Abb. 1.6). Durch diese Modifikation sind Mikromanipulator, optische Beobachtung und Schwingungsdämpfung nicht mehr nötig. Das Verfahren kann miniaturisiert und automatisiert werden und erfordert weniger handwerkliches Geschick. Daher ist diese Variation der Patch Clamp Technik speziell für Anwendungen der Pharmaforschung, die einen hohen Durchsatz erfordern, interessant. Sie bietet auch einige Vor-

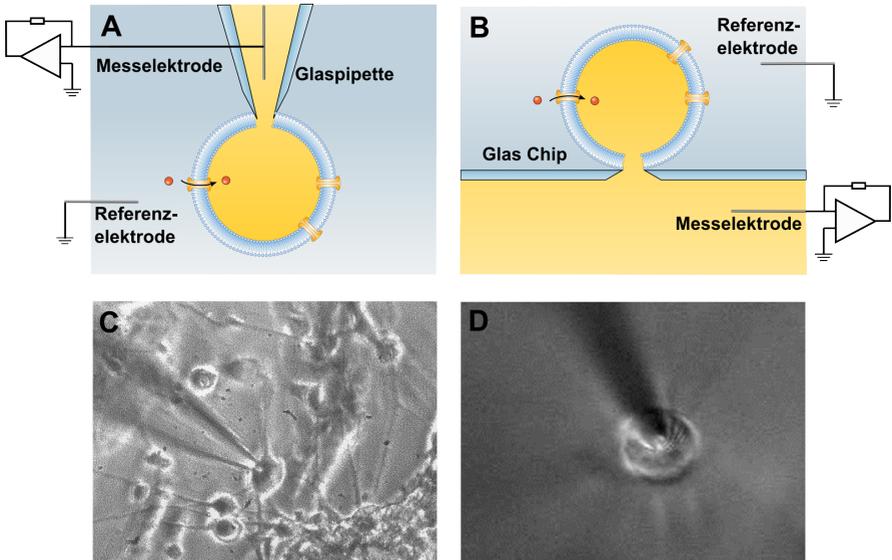


Abbildung 1.6: Planare und konventionelle Patch Clamp Technik. A: Konventioneller Aufbau. Eine Zelle wird mithilfe einer Patch Clamp Pipette untersucht. Diese bildet mit der Zellmembran eine elektrisch dichte Verbindung, den sogenannten Gigaseal. Mit einer Elektrode innerhalb der Pipette können die Ionenströme über die Membran abgeleitet werden. B: Planarer Aufbau. Eine Zelle wird durch Unterdruck auf einer mikrostrukturierten Glasfläche positioniert. Auch hier bildet die Membran einen Gigaseal mit dem Glas aus. Die Elektrode zur Ableitung befindet sich nun auf der unteren Seite des Glaschips. C: Mikroskopische Hellfeld Aufnahme von konventionellem Patch Clamp kultivierter Neuronen (Vogalis u. a., 2000). D: Durchlichtmikroskopie einer einzelnen Zelle positioniert auf einem planaren Patch Clamp Chip.

teile für Fragestellungen der Grundlagenforschung, insbesondere ist sie gut geeignet für Zellen oder andere Objekte, die sich in Suspension befinden, oder besonders klein sind. Auch bietet das System durch gute Zugänglichkeit der zellinternen Seite einfache Möglichkeiten, diese zu perfundieren. Die Einfachheit dieser Technik limitiert jedoch auch die wissenschaftlichen Möglichkeiten. Von den vier Patch Clamp Konfigurationen sind nur „cell attached“ und „whole cell“ erreichbar. Weil eine Zellsuspension verwendet werden muss, kann keine individuelle Zelle ausgewählt werden und Zellen in einem Gewebeverband können nicht untersucht werden. (Dunlop u. a., 2008)

1.4.2 Künstliche Lipidmembranen

Anstatt Ionentransportsysteme in nativen Zellen zu untersuchen besteht die Möglichkeit, aufgereinigte Proteine in künstlich hergestellten Lipid-Doppelschichten, sogenannten Bilayern oder Black Lipid Membranes (BLMs), zu studieren. Künstliche Bilayer bestehen aus Phospholipiden, die in einer Doppelschicht angeordnet über einer Apertur aufgespannt sind und zwei Kompartimente mit wässriger Lösung voneinander trennen. Auf diese Weise wird eine Biomembran imitiert, in die Proteine eingebracht werden können.

Es existieren verschiedene Methoden zur Herstellung künstlicher Bilayer (Abb. 1.7). Die älteste und bekannteste Methode ist das „Painting“, bei dem eine Phospholipid-Doppelmembran mithilfe eines Pinsels oder eines ähnlichen Werkzeugs über eine Apertur in einer Teflonmembran aufgespannt werden (Mueller u. a., 1962). Eine Variation ist das „Dipping“, bei dem ein Träger in eine Flüssigkeit mit einer Lipidmonoschicht auf der Oberfläche eingetaucht wird (Montal und Mueller, 1972). Dafür kann wieder eine Teflonschicht mit einer Apertur von wenigen Mikrometern oder eine Patch Clamp Pipette verwendet werden, welche dann zweimal in die Flüssigkeit getaucht wird („Tip

Dip“ (Coronado und Latorre, 1983). Ein ganz anderer Ansatz ist das „Spreading“. Dabei werden in einem ersten Schritt große unilamellare Lipidvesikel (Giant Unilamellar Vesicles (GUVs)) erzeugt, meist durch Elektroformation. Die Vesikel werden dann mit einer Patch Clamp Pipette oder einem Patch Clamp Chip in Verbindung gebracht. Bei Kontakt mit Glas platzen die Vesikel auf und bilden ein Bilayer.

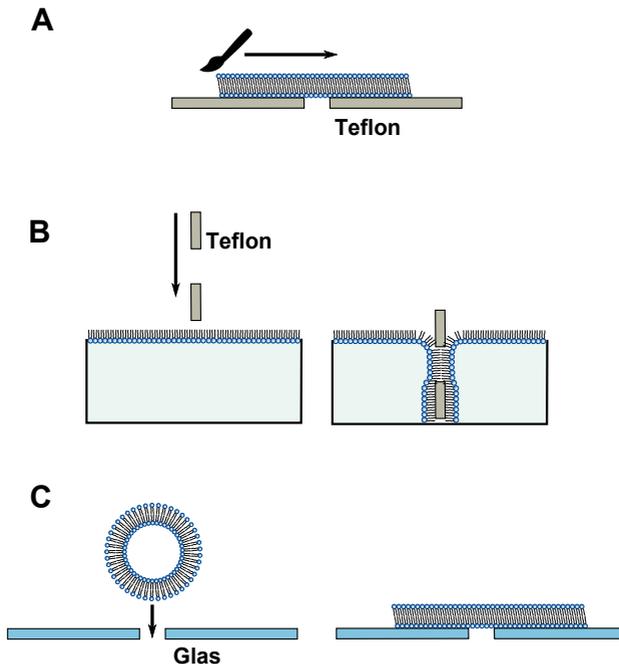


Abbildung 1.7: Verschiedene Methoden zur Herstellung von künstlichen Lipid-Doppelschichten. A: Painting. Die Lipidschicht wird mithilfe eines feinen Pinsels aufgetragen. B: Dipping. Ein Träger wird in eine Flüssigkeit mit Lipidmonoschicht auf der Oberfläche eingetaucht. C: Spreading. Unilamellare Vesikel platzen auf einer Glasoberfläche auf und bilden Bilayer.

Die elektronische Messtechnik für Bilayerexperimente ähnelt der der Patch Clamp Technik. Die Ionenströme durch die Lipidmembran werden mithilfe

zweier Elektroden in den durch das Bilayer getrennten Kompartimenten registriert, wobei meist ein Patch Clamp Verstärker zum Einsatz kommt. Die aufgezeichneten Ionenströme in Bilayern sind Einzelkanalströme. Makroskopische Ströme können nur in Ausnahmefällen erzeugt werden, denn sind zu viele Proteine in den wenige Mikrometer kleinen Bilayern eingelagert, werden diese instabil und reißen.

Die Bilayer Technik ist aufgrund ihres sehr geringen Hintergrundrauschens sehr gut geeignet für die Untersuchung von Einzelkanalaktivitäten, die sich im Bereich von wenigen Picoampere befinden. Im Idealfall können die beobachteten Ionenleitfähigkeiten einem bestimmten Protein zugeordnet werden. Einzelne Proteinen können isoliert von ihrer Umgebung und möglichen Einflussfaktoren beobachtet werden. Außerdem ist es möglich, Proteine von Quellen zu untersuchen, die nicht ohne weiteres für die Patch Clamp Technik geeignet sind, wie beispielsweise von Bakterien oder Pflanzen.

Dem steht gegenüber, dass die Experimente sehr aufwändig und stör anfällig sind. Die physikalischen Eigenschaften der Bilayer sind zudem nicht mit denen einer nativen Membran identisch. Ein weiterer schwerwiegender Nachteil ist, dass durch den Prozess der Purifikation Untereinheiten verloren gehen können oder kontaminierende Proteine eventuell copurifiziert werden. Die beobachtete Kanalaktivität entspricht aufgrund des künstlichen Systems und der langen Prozessierung der Proteine also nicht notwendigerweise den realen physiologischen Eigenschaften.

1.4.3 Festkörpergestützte Membranen

Die Forschung an Transportern ist ein viel jüngerer Feld als die Ionenkanalforschung. Bis 1980 wurde angenommen, Transporter würden sich wie eine

Fähre mit ihrem gebundenen Substrat durch die Membran bewegen. Modernere Modelle zeigen Transporter als Transmembranproteine, wie Kanäle. Doch während Kanäle einen selektiven Durchgang formen können, wird für Transporter heute allgemein der „alternating access“ Mechanismus angenommen. Das bedeutet, dass Transporter zu keinem Zeitpunkt eine durchgängige Pore bilden, sondern in einem komplexen Ablauf von Konformationsveränderungen ihre Substrate auf einer Seite der Membran aufnehmen und auf der anderen Seite entlassen. Bei diesen Zyklen von Konformationsänderungen werden also nur einzelne Moleküle oder Ionen transportiert, entsprechend ist die Flussrate von Transportern generell niedriger als die von Kanälen. Kristallstrukturen von Transportern, darunter AcrB, ein protonengekoppelter Transporter (Murakami u. a., 2002), sarcoplasmatische Ca-ATPase (Toyoshima u. a., 2000) und der ABC-Transporter BtuCD (Locher u. a., 2002) unterstützen dieses Modell. Tatsächlich ist die Abgrenzung von Kanälen und Transportern aber bisweilen schwierig, denn es gibt sowohl strukturelle als auch funktionelle Überschneidungen. Am Fall des Chloridtransporters CFTR wird dies deutlich. Nach seiner Sequenzhomologie wird CFTR den ABC-Transportern zugeordnet, jedoch zeigt er aufgrund nur geringer Mutationen in kritischen Transmembrandomänen die Funktionalität eines Kanals (Bai u. a., 2011).

Zur direkten funktionellen Untersuchung von Transportern werden meist andere Ansätze als bei Ionenkanalstudien verfolgt. Viele Transporter sind nicht elektrogen, erzeugen also keine Nettoladungsverschiebung. Es können daher ausschließlich Veränderungen der Substratkonzentrationen beobachtet werden. Dies geschieht mithilfe von radioaktiven oder fluoreszenzbasierten Fluss-Assays. Diese Klasse von Transportern soll hier nicht weiter thematisiert werden, da der Fokus dieser Arbeit auf elektrophysiologischen Methoden liegt.

Elektrogene Transporter, also Ionentransporter, die eine Nettoladungsver-

schiebung erzeugen, können mithilfe elektrophysiologischer Methoden untersucht werden, welche sehr viel detailliertere Einblicke liefern können als Fluss-Assays. Problematisch ist hierbei, dass Transporter nur einen maximalen Teilchenfluss von ca. 10^4 Ionen/s erreichen (Ionenkanäle erreichen $10^7 - 10^8$ Ionen/s). Bei einigen elektrogenen Transportern mit hoher Transportrate, wie natriumgekoppelten Glutamat Transportern (EAATs, Wadiche und Kavanaugh (1998)) oder Zuckertransportern (SGLTs, Wright u. a. (2011)), ist es möglich, Ionenströme mithilfe der Patch Clamp Technik aufzuzeichnen. In seltenen Fällen sind native Transportströme messbar, öfter kann durch heterogene Expression in Säugerzellen oder in Oocyten ein Strom auflösbarer Größe erzeugt werden. Für Transporter, die nicht in Säugerzellen exprimiert werden können, wie die meisten bakteriellen, pflanzlichen oder intrazellulären Transporter, ist die Patch Clamp Technik in diesem Fall gar nicht anwendbar. Hier muss auf Fluss-Assays mit künstlichen Liposomen oder Membranvesikeln zurückgegriffen werden.

Für die Studie elektrogener Transporter und Pumpen stellt die Arbeit mit festkörpergestützten Membranen (Solid Supported Membranes (SSMs)) (Abb. 1.8) eine Alternative zur Patch Clamp Technik dar. Ähnlich wie bei Bilayer-techniken werden hier künstliche Lipidmembranen genutzt. Diese befinden sich jedoch direkt auf einem festen Substrat, meist Gold, und sind daher mechanisch sehr viel stabiler als konventionelle freistehende Bilayer, welche nur Durchmesser von wenigen Mikrometern erreichen können, bevor sie reißen. Die auf Substraten gebildeten Lipidmembranen sind Monoschichten, die Phospholipide in wässriger Umgebung spontan auf einer hydrophoben Thiol-schicht ausbilden. Im Gegensatz zu Bilayer-techniken wird das Zielprotein nicht direkt in der künstlichen Membran rekonstituiert. Stattdessen werden Liposomen oder Membranvesikel, die das Protein enthalten, durch Lipid-Lipid Wechselwirkungen auf der festkörpergestützten Membran immobilisiert (Abb. 1.8 A). Aufgrund ihrer hohen Stabilität können SSM's mit mehreren

Millimetern Durchmesser erzeugt werden, auf denen eine entsprechend große Anzahl von Liposomen oder Vesikeln gebunden werden kann. Die gesamte Proteinmenge auf einer SSM von 3 mm Durchmesser entspricht ungefähr dem Protein von bis zu 10 000 eukaryotischen Zellen, und ist damit sehr viel größer als bei Bilayertechniken oder bei der Patch Clamp Technik. Hierin liegt ein Hauptvorteil der SSM basierten Elektrophysiologie, denn durch zeitlich getriggerte Aktivierung aller immobilisierten Transportproteine kann ein Summenstrom von auflösbarer Amplitude erzeugt werden. (Bamberg u. a., 1993; Pintschovius und Fendler, 1999)

Die Aktivierung der Transportproteine auf der SSM erfolgt durch die Applikation entsprechender Substrate mithilfe eines schnellen Perfusionssystems. Der elektrogene Transportvorgang verursacht einen Ladungstransport in oder aus den Liposomen, die auf der SSM immobilisiert sind, bis ein elektrochemisches Gleichgewicht erreicht ist. Da die SSM nicht leitfähig ist, kann die angesammelte Ladung nicht abfließen. Die SSM besitzt jedoch eine sehr hohe elektrische Kapazität (der Aufbau gleicht einem Plattenkondensator), weshalb das durch die Ladungsakkumulation entstandene elektrische Feld einen Ausgleichsstrom auf die Goldschicht erzeugt (Abb. 1.8 C). Dieser Ausgleichsstrom entspricht in Größe und zeitlicher Auflösung der Ladung, die durch den Transportprozess in die Liposomen auf der SSM gelangt. Mit einem Transimpedanzverstärker kann das Messsignal an der Goldelektrode abgenommen werden. Die Verstärkertechnik gleicht der der Patch Clamp Technik, wobei jedoch nicht gegen eine Kommandospannung („voltage clamp“) sondern ein definiertes Bezugspotential gemessen wird (Abb. 1.8 B). Der zu beobachtende transiente Transportstrom dauert zwischen 0,5 und 2 Sekunden an und erreicht Amplituden bis zu mehreren Nanoampere. Ähnlich wie bei der Patch Clamp Technik handelt es sich also um eine Echtzeitmessung. (Kelety u. a., 2006; Seifert u. a., 1993)

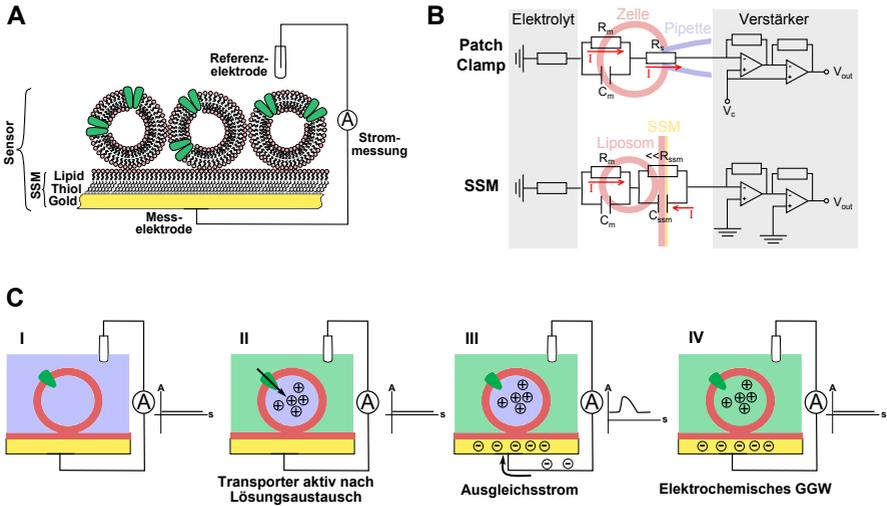


Abbildung 1.8: SSM basierte Messung von Transporterströmen. A: Aufbau des Messensors. Ein Goldsubstrat, das sowohl Träger für die Membran als auch Elektrode ist, wurde mit einem Alkanthiol beschichtet. Auf dieser hoch hydrophoben Oberfläche kann sich ein Lipid Monolayer ausbilden. Dieser Aufbau wird festkörpergestützte Membran (solid supported membrane, SSM) genannt. Auf dieser können Liposomen oder Membranvesikel, die das zu untersuchende Transportprotein enthalten, immobilisiert werden. B: Ersatzschaltbild der Transporter-Strommessung. Dargestellt im Vergleich zur Patch Clamp Messung. Bei beiden Techniken bildet die zu messende Membran ein RC Glied mit R_m und C_m . Bei der SSM basierten Messung bildet die SSM ein zweites RC-Glied, wobei der Widerstand R_{SSM} sehr hoch ist, und der zu messende Strom über C_{SSM} fließt. Die Verstärkertechniken gleichen sich, jedoch wird bei der SSM basierten Messung keine Kommandospannung appliziert, sondern gegen Erde gemessen. C: Ablauf eines Aktivierungszyklus. (I) Ausgangssituation. (II) Durch einen Lösungsaustausch wird das Substrat zugegeben, der Transporter wird aktiv, Ladung sammelt sich in den Vesikeln. (III) Diese elektrische Ladung generiert ein E-Feld, welches einen messbaren Ausgleichsstrom erzeugt, bis die Ladung in den Vesikeln durch eine entsprechende Gegenladung auf der Goldelektrode kompensiert wird. (IV) Nachdem ein elektrochemisches Gleichgewicht erzeugt worden ist, findet kein weiterer Stromfluss statt.

Diese Technologie bietet nicht nur den Vorteil einer hohen Sensitivität durch die Messung von Summenströmen, sondern ermöglicht auch die Verwendung von sehr unterschiedlichem Ausgangsmaterial. Auf der SSM können sowohl künstlich hergestellte Liposomen mit rekonstituiertem Protein, als auch native Membranvesikel aus eukaryotischer und prokaryotischer Plasmamembran oder intrazellulären Membranen immobilisiert werden. Die Technik wurde erfolgreich eingesetzt zur Messung des Protonentransports durch die Komplexe der Atmungskette (Watzke u. a., 2010), zur Charakterisierung der endoplasmatischen Calcium ATPase (Tadini-Buoninsegni u. a., 2008), und einiger bakterieller Transporter (Grewer u. a., 2013). Dennoch ist die SSM basierte Elektrophysiologie bisher wenig etabliert.

1.4.4 Elektrophysiologische Techniken für Mitochondrien

Die IMM elektrophysiologisch zu untersuchen ist sehr aufwändig. Dies liegt an der Größe der Organells (0,5 bis 1 μm) und der besonders schweren Zugänglichkeit der elektrophysiologisch interessanten IMM. Denn Mitochondrien sind nicht nur innerhalb eukaryotischer Zellen positioniert, sie besitzen auch ein doppeltes Membransystem und bilden komplexe Netzwerke untereinander sowie mit dem endoplasmatischen Retikulum (Abb. 1.9 A + B).

Elektrophysiologische Untersuchungen der IMM können an isolierten und in künstlichen Lipidmembranen rekonstituierten Proteinen oder Membranfragmenten durchgeführt werden. Dabei müssen die Nachteile des künstlichen Systems in Kauf genommen werden. Alternativ können direkte Patch Clamp Messungen an Mitoplasten durchgeführt werden. Um die IMM für die Patch Clamp Technik zugänglich zu machen, muss das Organell isoliert, die äußere Membran entfernt und das Organell vergrößert werden. Das kann durch osmotische Schwellung von isolierten Mitochondrien erreicht werden. In hypotoner

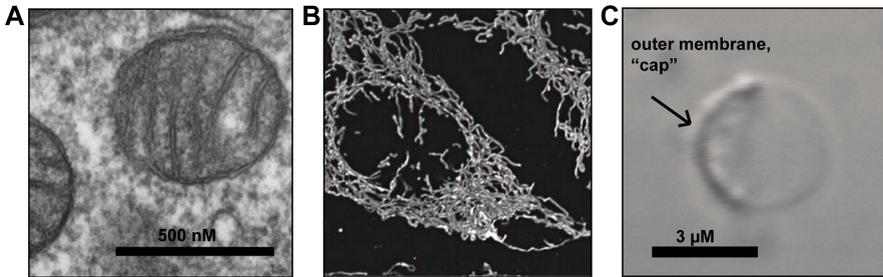


Abbildung 1.9: Mitochondriale Strukturen. A: Elektronenmikroskopische Aufnahme einzelner Mitochondrien in der Lunge (Louisa Howard, <http://remf.dartmouth.edu/images/mammalianLungTEM/source/8.html>). B: Verteilung von Mitochondrien in einer Zelle. Die einzelnen Organellen bilden durch Fusion ein retikuläres Mitochondriennetzwerk. Abbildung aus Benard und Karbowski (2009). C: Lichtmikroskopische Aufnahme eines einzelnen Mitoplasten. Die OMM ist noch als „Cap“ mit dem Mitoplasten verbunden. Abbildung aus Kirichok u. a. (2004)

Umgebung platzt die äußere Membran auf, während die innere Membran ihre Cristae entfalten kann und so Vesikel von 3-6 μm Durchmesser bildet. Die OMM ist oft noch als Kappe („Cap“) mit dem geschwollenen Mitochondrium, jetzt Mitoplast genannt, verbunden (Abb. 1.9 C). Um Mitoplasten mit der Patch Clamp Technik zu untersuchen, werden sie meist auf einer Oberfläche immobilisiert, und Pipetten mit sehr kleiner Öffnung verwendet (Keller und Hedrich, 1992). Diese Methodik ist die einzige Möglichkeit, mitochondriale Ionentransportsysteme in einer nativen Umgebung elektrophysiologisch zu untersuchen. Einige wenige sehr erfolgreiche Studien, wie von Kirichok u. a. (2004) zum mitochondrialen Calciumkanal MCU, zeigen das große Potential dieser Methode. Generell sind aber nur wenige Arbeiten mit Mitoplasten veröffentlicht worden, wohl aufgrund der aufwändig zu erlernenden und ineffizienten Methodik.

1.4.5 Elektrophysiologische Techniken für Bakterien

Die Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften bakterieller Ionentransportsysteme gestaltet sich ähnlich schwierig wie bei Organellen. Obwohl Bakterien nicht in einen größeren Organismus eingebunden sind und damit die Zugänglichkeit erleichtert wird, sind sie mit ca. $1 \mu\text{m}$ sehr viel kleiner als eukaryotische Zellen (ca. $10 \mu\text{m}$). Damit sind sie zu klein für Patch Clamp Pipetten, deren Spitzen selbst im Bereich von $1 \mu\text{m}$ liegen. Außerdem besitzen ein Großteil der Bakterienzellen eine Zellwand und gegebenenfalls eine äußere Membran, die den direkten Zugang zur elektrophysiologisch interessanten Plasmamembran versperren.

Um dennoch eine elektrophysiologische Untersuchung möglich zu machen, werden bakterielle Proteine isoliert und in künstlichen Lipidmembranen rekonstituiert. Dies ist gut etabliert und momentan die Methode der Wahl zur Untersuchung bakterieller Ionenkanäle. Auch hier müssen die Nachteile dieser unphysiologischen Technik in Kauf genommen werden. Eine Alternative stellt die Arbeit mit Sphäroplasten dar. Durch Cefalexin, einem Antibiotikum aus der Klasse der Cephalosporine, das die Transpeptidase und damit die korrekte Ausbildung der Zellwand hemmt, kann eine Volumenvergrößerung der Bakterienzellen erreicht werden. Es bilden sich bis zu $50 \mu\text{m}$ lange, filamentöse Zellen. Anschließend wird die Zellwand durch Lysozymverdau entfernt. Die Bakterienzellen verlieren mit der stützenden Zellwand auch ihre langgestreckte Form und bilden Kugeln (Abb. 1.10). Diese ca. $5\text{-}10 \mu\text{m}$ großen, sphärischen, hauptsächlich aus der inneren Zellmembran bestehenden Objekte werden Sphäroplasten genannt (Withold u. a., 1976).

Die ersten elektrophysiologischen Untersuchungen von Sphäroplasten mit der Patch Clamp Technik wurden von Boris Martinac durchgeführt und führten unter anderem zur Entdeckung der endogenen mechanosensitiven Kanäle

(MscL, MscS) in *E. coli* (Martinac u. a., 1987). Auch eine endogene anionenselektive Leitfähigkeit wurde beschrieben (Kubalski, 1995). Mario Meng-Chiang Kuo konnte die bakteriellen Kanäle MthK, einen calciumaktivierten Kaliumkanal (Kuo u. a., 2007a) und MmaK, einen durch zyklische Nukleotide gesteuerten Kaliumkanal aus *Magnetospirillum magnetotacticum* (Kuo u. a., 2007b), erfolgreich in *E. coli* exprimieren und in Sphäroplasten elektrophysiologisch untersuchen. Sphäroplasten bieten die einzige Möglichkeit, bakterielle Ionenkanäle in ihrer physiologischen Umgebung zu untersuchen, aber stellen, ähnlich wie Mitoplasten, eine besondere Herausforderung für die Patch Clamp Technik dar. Bis heute findet diese Technik deshalb äußerst selten Anwendung.

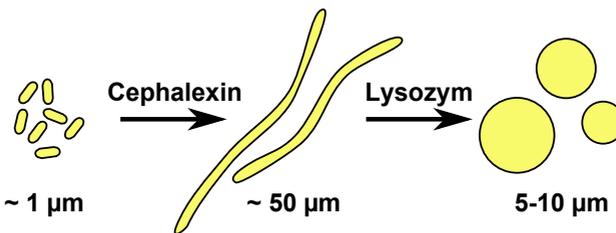


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der Erzeugung von Sphäroplasten aus Bakterienzellen. Durch die Behandlung der Zellen mit Cefalexin, einem halbsynthetischen Antibiotikum aus der Gruppe der Cephalosporine, bilden sich lange, fadenförmige Objekte. Sie bestehen aus mehreren einzelnen Bakterienzellen, welche sich durch die Wirkung des Antibiotikas nach der Zellteilung nicht mehr abtrennen konnten. Wird in einem zweiten Schritt die Zellwand durch Lysozymverdau entfernt, bilden sich die kugelförmigen Sphäroplasten.

Auch für die Untersuchung mechanosensitiver bakterieller Kanäle ist das wichtigste Werkzeug die Patch Clamp Technik mit Sphäroplasten. Die Aktivierung der Kanäle erfolgt dabei durch das Anlegen von Unterdruck über die Patch-Pipette. Die alternative Verwendung von isoliertem Protein in Bilayern gestaltet sich in diesem Fall schwierig. Denn bei klassischen Bilayer-Methoden kann systembedingt kein Druck appliziert werden. Die einzige Möglichkeit,

rekonstituiertes Protein zu untersuchen ist, Liposomen, ähnlich wie Zellen, mithilfe einer Patch-Pipette zu untersuchen. Den Techniken ist gemein, dass störende mechanische Einflüsse kaum vermieden werden können und der angelegte Druck zur Aktivierung schwer kontrollierbar und stark vom verwendeten System abhängig ist. Für die elektrophysiologische Untersuchung bakterieller mechanosensitiver Ionenkanäle ist ein hochkomplexer experimenteller Ablauf von Nöten, welcher nicht nur einen erfahrenen Experimentator erfordert, sondern auch die wissenschaftlichen Möglichkeiten einschränkt und Resultate mit schlechter Reproduzierbarkeit liefert.

Bakterielle Transporterströme können mit Patch Clamp Technik oder Bilayermethoden nicht untersucht werden. Einzelne Bilayer, Liposomen oder Sphäroplasten enthalten zu geringe Proteinmengen, um einen Transportstrom auflösbarer Größer zu erzeugen. Hier finden üblicherweise Fluss-Assays mit Liposomen Anwendung. Eine Alternative ist die Verwendung SSM basierter Methoden (Kap. 1.4.3).

1.5 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten geeignete Methoden für die funktionelle elektrophysiologische Untersuchung bakterieller und mitochondrialer Ionen-transportproteine neu entwickelt und auf ungeklärte Fragestellungen angewendet werden.

Für die Untersuchung mitochondrialer Ionenkanäle sollte eine verbesserte Methodik entwickelt werden. Durch die Verwendung eines planaren Patch Clamp Systems und die Etablierung eines geeigneten Präparationsprotokolls, sollte eine effiziente Patch Clamp Methode zur Untersuchung nativer Mito-

plasten entwickelt werden. Diese sollte genutzt werden, um den putativen mitochondrialen Kaliumkanal $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ zu identifizieren und zu charakterisieren. Dazu wurden die kardialen Mitochondrien von zur Verfügung stehenden $\text{KCNMA1}/\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ knock-out und wild-typ Mäusen in Bezug auf ihre elektrophysiologischen Eigenschaften verglichen.

Für die Arbeit mit mechanosensitiven bakteriellen Ionenkanälen sollten zwei alternative Methoden entwickelt und verglichen werden. Die Patch Clamp Technik mit Sphäroplasten sollte zur Verbesserung auf ein planares System übertragen werden, gleichzeitig sollte eine Möglichkeit zur Verwendung von Bilayern etabliert werden. Die Arbeit mit bakteriellen mechanosensitiven Ionenströmen ist bisher aufwändig und schlecht reproduzierbar. Die planare Patch Clamp Technik bietet die Möglichkeit zur Automatisierung des Patch-Vorganges und der Druckapplikation, wodurch eine deutliche Vereinfachung der Technik und eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit erreicht werden könnten.

Zur funktionellen Charakterisierung bakterieller Iontentransporter sollte die SSM-basierte Methodik adaptiert werden. Dies sollte am Beispiel des prokaryotischen Iontentransporters NCX_Mj geschehen. NCX_Mj dient als Strukturmodell für die humanen NCX Isoformen, funktionelle Daten stehen aufgrund fehlender Methodiken aber nur sehr wenige zur Verfügung. Mithilfe der entwickelten Methode sollte NCX_Mj elektrophysiologisch charakterisiert werden.

2 Methoden

2.1 Präparation kardialer Mitoplasten

2.1.1 Isolation kardialer Myocyten aus Mäuseherzen

Vitale Kardiomyocyten wurden durch enzymatischen Verdau von Mäuseherzen durch retrograde Perfusion der Aorta gewonnen, wie zuvor von Fenske u. a. (2011) beschrieben.

Die Herzen wurden isoliert und sofort für 5 Minuten bei 37 °C zur Reinigung mithilfe einer Langendorff Apparatur perfundiert.

Kardiomyocyten Perfusionspuffer

113 *mM* NaCl
4,7 *mM* KCl
0,6 *mM* KH₂PO₄
0,6 *mM* Na₂HPO₄
1,2 *mM* MgSO₄
0.032 *mM* Phenolrot
12 *mM* NaHCO₃
10 *mM* HEPES pH 7,4
30 *mM* Taurin
5,5 *mM* Glucose
10 *mM* BDM (2,3-Butanedione monoxime)

Anschließend wurde für 25 Minuten bei 37° C mit collagenasehaltigem Puffer perfundiert, um das Gewebe aufzutrennen.

Kardiomyocyten Collagenasepuffer

Kardiomyocyten Perfusionspuffer

1 *mg/ml* Collagenase B

12.5 μM CaCl₂

Schließlich wurde das Herz von der Apparatur genommen, mit einer 10 *ml* Pipette vorsichtig mechanisch dispergiert und die Zellen bei 100xg für 1 Minute abzentrifugiert. Das Pellet wurde sofort auf Eis gelegt und mit der Mitochondrienisolation fortgeföhren.

2.1.2 Mitoplasten Präparation

Mitochondrien wurden mit einem modifizierten Verfahren nach Frezza u. a. (2007) isoliert. Die pelletierten Kardiomyocyten eines ganzen Mausherzens wurden in 800 μl eisgekühltem Mitochondrien-Isolationspuffer resuspendiert und mechanisch durch das Potter-Elvehjem Verfahren aufgeschlossen (Teflon auf Glas, 12 Stöße bei 900 *rpm*). Intakte Zellen wurden durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 700xg pelletiert, der Überstand in zwei 1,5 *ml* Eppendorf Gefäße verteilt und bei 3000xg für 15 Minuten die Mitochondrien pelletiert. Die Pellets wurden in je 200 μl Mitochondrien-Isolationspuffer resuspendiert und der Schritt wiederholt. Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Das Pellet kann mit möglichst wenig Flüssigkeit bis zu einem Tag lang auf Eis gelagert werden.

Mitochondrien-Isolationspuffer

10 *mM* Tris-MOPS pH 7,4

1 *mM* EGTA

200 *mM* Saccarose

1:25 Proteinaseinhibitor Complete (Roche)

Mitoplasten wurden nach Siemen u. a. (1999) durch osmotisches Schwellen der

Mitochondrien in hypotonem Puffer erzeugt. Dazu wurde ein Pellet in 100 μl hypotonem Puffer resuspendiert und für 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Wiederherstellen der Isotonizität durch Zugabe von 20 μl hypertonem Puffer gestoppt.

Mitoplasten-Puffer, hypoton

150 *mM* KCL

4 *mM* Saccharose

1 *mM* EGTA

30 *mM* HEPES pH 7,4

Mitoplasten-Puffer, hyperton

750 *mM* KCL

1 *mM* EGTA

30 *mM* HEPES pH 7,4

Die Mitoplasten wurden vor jedem Experiment frisch hergestellt, auf Eis gelagert und maximal 2 Stunden lang für Experimente verwendet.

2.2 Präparation von Sphäroplasten

Sphäroplasten wurden aus dem MscL knock-out *E. coli* Stamm PB104 nach einem Protokoll von Blount und Moe (1999) hergestellt. Aus einer Einzelkolonie wurde eine Übernachtskultur angesetzt (10 ml LB-Medium, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol). Am Folgetag wurde eine frische Kultur durch 1:50 Verdünnung hergestellt und bis zum Erreichen einer OD600 von 0,4 inkubiert. Eine weitere frische Verdünnung (1:10) mit Cephalexin (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zur Unterbindung der Zellwandsynthese wurde für eine Stunde inkubiert und anschließend durch Zugabe von 0,1% Arabinose die Genexpression initiiert.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4000 *rpm*, 4 °C, 10 min) geerntet und die Zellwand durch die aufeinander folgende Zugabe folgender Reagenzien verdaut: 120 μ l 1 M Tris-HCl Puffer pH 7,8, 120 μ l Lysozyme (5 *mg/ml*), 30 μ l DNase (5 *mg/ml*) und 120 μ l 0,125 M EDTA pH 8. Der enzymatische Verdau wurde nach 1,5 bis 3 Minuten durch Zugabe von Stopp-Puffer unterbrochen.

Stopp-Puffer

10 *mM* TrisHCL pH 7,8
0,7 *M* Saccarose
20 *mM* MgCl₂

Die Sphäroplasten wurden anschließend selektiert: Sphäroplastenhaltige Lösung wurde auf 7 *ml* Stopp-Puffer aufpipettiert und 2 Minuten bei 4 °C und 1500 *rpm* in einem Ausschwingrotor abzentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

2.3 Isolation von Zellmembranen

NCX1 exprimierende HEK-293 Zellmembranen wurden zur Verfügung gestellt. Sie wurden gewonnen wie durch Krause u. a. (2009) beschrieben.

2.4 Heterogene Expression und Isolation von Proteinen

MscL wurde nach bekanntem Protokoll (Kocer u. a., 2007) in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Dazu wurde der nativ-MscL depletierte *E. coli* Stamm PB104 (Blount u. a., 1996) verwendet. Eine Einzelkolonie wurde für

einen Tag in 10 ml Luria-Bertani (LB) Medium plus 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 10 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol inokuliert. Durch Verdünnung 1:1000 wurde daraus eine Übernachtskultur angesetzt. Anschließend wurden die Zellen in 2-Liter Fermentern (1:40 Verdünnung) in LB Medium plus 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 10 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol bis zu einer OD600 von 2,5 wachsen gelassen. Die Expression wurde durch 0,1% Arabinose induziert. Nach weiteren zwei Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert und mit 25 mM Tris-HCl (pH 8) gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Zell-Disruptor von Constant Systems bei 25000 psi mechanisch aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 18460xg für 30 Minuten bei 4 ° C pelletiert. Der Überstand wurde anschließend bei hoher Umdrehungszahl (145400xg, 90 Minuten, 4 ° C) zentrifugiert, die resultierenden Vesikel in 25 mM Tris-HCl, pH 8, homogenisiert, auf eine Endkonzentration von 0,7 g/ml gebracht und gegebenenfalls bis zu weiteren Verwendung bei -80 ° C gelagert.

Zur Proteingewinnung wurden die Vesikel in detergentenhaltigem Puffer aufgelöst, unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 267000xg und 4 ° C für 20 Minuten entfernt.

Detergenzhaltiger Puffer

1% Triton X-100
300 mM NaCl
50 mM Na₃PO₄
35 mM Imidazole
pH 8

Der Überstand wurde auf eine Nickel-NTA-Matrix aufgebracht und für 30 Minuten bei 4 ° C inkubiert. Das gebundene Protein wurde mit einem Waschpuffer und 50 mM Histidinpuffer gespült, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen.

MscL wurde anschließend mithilfe eines 235 mM Histidinpuffers von der

Waschpuffer

0,2% Triton X-100
50 mM Na₃PO₄
300 mM NaCl
35 mM Imidazole
pH 8

Histidin Waschpuffer

0,2% Triton X-100
50 mM Na₃PO₄
300 mM NaCl
50 mM Histidin
pH 8

Säule eluiert.

Histidin Eluationspuffer

0,1% Triton X-100
50 mM sodium phosphate
300 mM NaCl
235 mM Histidin
pH 8

Isoliertes NCX_Mj Protein wurde für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.
Die Isolation wurde durchgeführt wie durch Liao u. a. (2012) beschrieben.

2.5 Herstellung von Lipidvesikeln

GUVs (giant unilamellar vesicles) wurden durch Elektroformation hergestellt (Vesicle Prep Pro, Nanion Technologies). Dabei bilden sich aus einer ungeordneten Lipidschicht mithilfe eines oszillierenden elektrischen Feldes große unilamellare Lipidvesikel.

20 μl einer Lipidlösung aus 10 mM DPhPC (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) und 1 mM Cholesterin, gelöst in Trichlormethan, wurden auf einem elektrisch leitfähigen Glasscheibchen (Indium-Zinn-Oxid beschichtet, ITO) gleichmäßig verteilt, so dass eine Kreisfläche von ca. 2 cm Durchmesser bedeckt ist (Abb. 2.1 A). Nachdem das Lösungsmittel nach sehr kurzer Zeit bei Raumtemperatur verdampft ist, wurde um die lipidbedeckte Fläche ein O-Ring als Abstandhalter positioniert und 270 μl einer 1 M Sorbitollösung auf das getrocknete Lipid pipettiert. Eine zweite ITO beschichtete Glasscheibe wurde aufgelegt. Der Aufbau wurde in die Reaktionskammer des Gerätes eingebracht und Elektroformation bei einer Wechselspannung von 3 V und 5 Hz für zwei Stunden durchgeführt. Die erhaltenen GUVs wurden mit 200 μl der Sorbitollösung verdünnt.

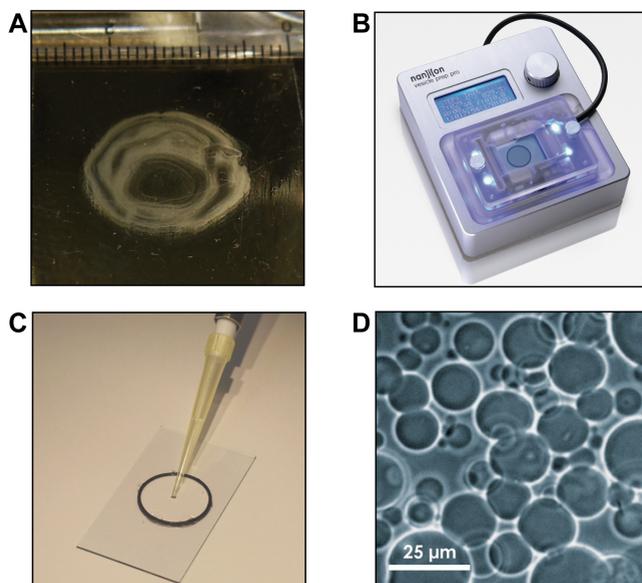


Abbildung 2.1: Herstellung von GUVs durch Elektroformation. A: Lipid wurde auf die leitfähige Seite eines ITO Glases aufgetragen. Nach Verdampfen des Lösungsmittels bildet sich ein weißlicher Lipidfilm. B: Mithilfe eines zweiten ITO Gläschens und eines O-Rings werden $270 \mu\text{l}$ Sobriollösung eingeschlossen, und der Aufbau in die Kammer des Vesicle Prep Pro Geräts eingespannt. C: Nachdem das Protokoll beendet wurde, müssen die GUVs vorsichtig vom Glas abgelöst werden. D: GUVs, beobachtet unter einem invertierten Phasen-Kontrast Mikroskop

2.6 Proteinrekonstitution in Lipidvesikeln

Zur Rekonstitution des isolierten MscL Proteins wurden 0,5 μl des in Detergenz gelösten Proteins zu 200 μl GUV-haltiger Lösung gegeben, durchmischt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Mit weiteren 200 μl Sorbitollösung wurde der Ansatz verdünnt und für zwei Stunden bei 4 °C inkubiert. Um die GUVs wieder zu stabilisieren wurde das Detergenz mithilfe von 10 mg Biobeads (Biorad) über Nacht bei 4 °C weitgehend entfernt. Nach Entfernen der Biobeads sind die GUVs für einige Tage stabil.

Zur Rekonstitution von NCX_MJ wurden 10 μl Protein der Konzentration 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und 200 μl GUV Präparation durch kurzes vortexen gemischt. Die Lösung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur, dann weitere zwei Stunden bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung des Detergenz wurden 10 mg Biobeads (Bio-Rad) zugegeben und die Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Biobeads vollständig entfernt, die proteinhaltigen Liposomen bei 4 °C gelagert und innerhalb von 5 Tagen verwendet.

2.7 Erzeugung von Bilayern aus GUVs

Die Experimente wurden am Port-a-Patch (Nanion Technologies) ausgeführt, wobei NPC1 Chips mit einem Widerstand von 3-5 $M\Omega$ verwendet wurden.

Elektrophysiologische Salzlösung extern und intern

350 mM KCl

10 mM HEPES, pH 7

Der Chip wurde mit 5 μl Pufferlösung auf beiden Seiten befüllt, die Offsetspannung korrigiert und 5 μl GUV-Lösung auf die Oberseite des Chips pipettiert.

Durch zügiges Anlegen eines negativen Drucks von -20 mBar/ 15 mmHg wurden Bilayer mit mehreren $G\Omega$ Widerstand erzeugt. $40 \mu\text{l}$ Puffer wurden zur externen Seite hinzugefügt, das Haltepotential auf -20 mV gesetzt und mit dem Messprotokoll begonnen.

2.8 Patch Clamp Methodiken

2.8.1 Mitoplasten Patch Clamp

Folgende elektrolytischen Salzlösungen wurden für die elektrophysiologischen Arbeiten verwendet:

Interne Salzlösung

60 mM KF
 60 mM K-Gluconat
 10 mM KCl
 10 mM HEPES
 200 mM Sorbitol

Externe Salzlösung

10 mM K-Gluconat
 10 mM HEPES
 1 mM Ca-Gluconat
 260 mM Sorbitol

$10 \mu\text{M}$ Rutheniumrot, $50 \mu\text{M}$ Propranolol, $10 \mu\text{M}$ Bepridil und $10 \mu\text{M}$ Cyclosporin A wurden zu beiden Lösungen frisch hinzugefügt, um den mitochondrialen Uniporter (MCU), den Anionentransporter der inneren Membran (IMAC), Slo2.2 und mPTP zu inhibieren.

Die Patch Clamp Experimente wurden mit dem planaren Patch Clamp Sys-

tem Port-a-Patch (Nanion Technologies, Abb. 2.2) und einem HEKA EPC-10 Verstärker durchgeführt. Es wurden NPC-1 Patch Clamp Chips mit einem Widerstand von 10-15 $M\Omega$ (Durchmesser $<1 \mu m$) und eine Salzbrücke (3 M KCl, 3% Agarose) auf der externen Seite verwendet.

Die Software des Systems ermöglicht es automatisierte Protokolle zum Fixieren einer individuellen Zelle aus der Lösung und zum Etablieren des Sealwiderstandes zu verwenden. Ein entsprechendes Protokoll wurde speziell für die Arbeit mit Mitoplasten entwickelt. Es wurden je 5 μl externe bzw. interne Lösung auf die jeweiligen Seiten des Patch Clamp Chips gegeben und anschließend das Protokoll gestartet. Zunächst wird die Offsetspannung korrigiert, anschließend ein negatives Potential von -20 mV angelegt. Nach Aufforderung durch das Programm werden 5 μl Mitoplastenpräparation auf die externe Seite des Chips pipettiert. Durch Druckpulse von -20 bis -100 mBar wird anschließend ein individueller Mitoplast auf dem Chip fixiert. Sobald der Widerstandswert 50 $M\Omega$ überschreitet, wird das Haltepotential schrittweise abgesenkt bis auf -100 mV . Im letzten Schritt wird nach Erreichen eines Gigaseals das Haltepotential auf -50 mV gesetzt und das Protokoll automatisch beendet.

Anders als bei Zellen war es nicht nötig, die Mitoplasten aktiv durch Unterdruck zu öffnen („whole cell“ Konfiguration). Dies geschieht schon während des Sealvorganges spontan, kann jedoch schwer beobachtet werden, da die Kapazitäten sich am Rande des messbaren Bereichs befinden. Nach Etablierung des Sealwiderstandes betragen die Kapazitäten ca. 1 pF . Unter der Annahme, dass auch die mitochondriale Membran eine Kapazität von ca. 1 $\mu F/cm^2$ besitzt, entspricht dieser Wert einer gemessenen Membranfläche von ca. 100 μm^2 (Formel 2.1), also einer Kugel von ca 5 μm (Formel 2.2). Auch wenn in Betracht gezogen wird, dass der Mitoplast nicht mehr als ideale Kugel vorliegt, sondern auf der Glasfläche deformiert wird, entspricht die Kapazität

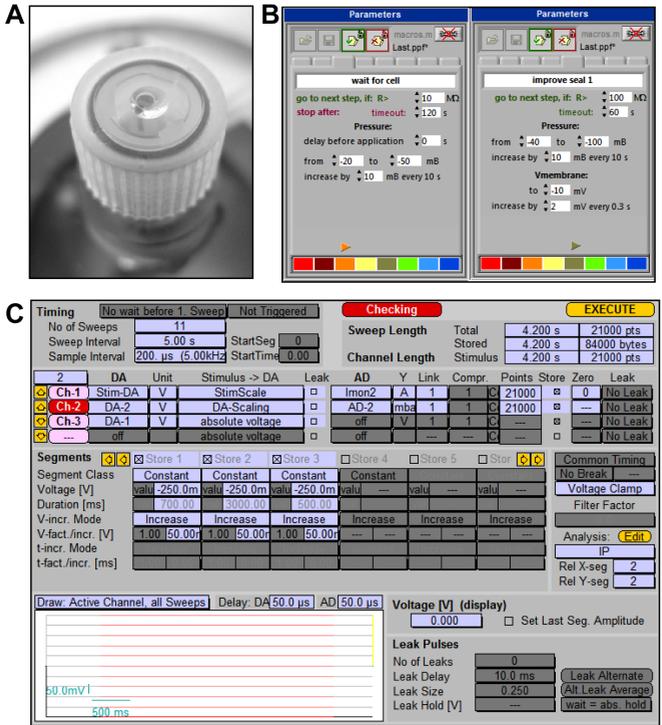


Abbildung 2.2: Planares Patch Clamp System „Port-a-Patch“ (Nanion Technologies). A: Ansicht auf den Patch Clamp Chip von oben, die faradaysche Schutzabdeckung ist entfernt. Der Chip ist bereits mit den Salzlösungen befüllt. B: Verstärkersoftware „Patch Master“ (Heka). Der Ausschnitt zeigt den Protokollgenerator für die Erstellung von Spannungsprotokollen. C: Software „Patch Control“ (Nanion Technologies). Ausschnitt zeigt das Parameterfenster in dem Protokolle zum Fixieren und Etablieren des Sealwiderstandes entworfen werden.

von 1 pF einem Kreis mit Radius 5,6 μm (Formel 2.3), also einer deutlich größeren Fläche als der von der mikrostrukturierten Apertur umschlossenen Fläche ($R < 0,5 \mu m$). Es kann also von einer „whole cell“ Konfiguration ausgegangen werden.

$$\frac{1pF}{1\frac{\mu F}{cm^2}} = 100\mu m^2 \quad (2.1)$$

$$r_{Kugel} = \sqrt{\frac{100\mu m^2}{4\Pi}} = 2,82\mu m \quad (2.2)$$

$$r_{Kreis} = \sqrt{\frac{100\mu m^2}{\Pi}} = 5,6\mu m \quad (2.3)$$

Da bei dem planaren Patch Clamp Setup keine Möglichkeit zur optischen Beobachtung integriert ist, wurde die Identität der Mitoplasten durch die reproduzierbare Beobachtung des gut beschriebenen Anionenkanals IMAC (Inner Membrane Anion Conductance) verifiziert. IMAC zeigt eine Leitfähigkeit von ca 100 pS und kann durch Propranolol Inhibiert werden (Beavis, 1992). Dies dient der Unterscheidung von Mitoplasten und vorhandenen Verunreinigungen, wie Zelltrümmern oder intakten Mitochondrien, in der Präparation, die möglicherweise auf die Apertur gesaugt werden könnten.

Folgendes Spannungsprotokoll wurde zur Beobachtung von mitoBK_{Ca} appliziert: Alle 5 Sekunden wurde ein Spannungssprung vom Haltepotential -50 mV auf 80 mV durchgeführt und für 2 Sekunden gehalten. Dieses Protokoll wurde 9 Minuten lang wiederholt, wobei nach den ersten 3 Minuten der BK_{Ca} Stimulator NS11021 (10 μM) (Bentzen u. a., 2007) appliziert wur-

de. Nach weiteren 3 Minuten wurde Paxilline (100 *nM*) als BK_{Ca} Inhibitor hinzugegeben. Die Amplituden der während der jeweiligen Phasen auftretenden Einzelkanalaktivitäten wurden identifiziert und die Häufigkeit ihres Auftretens auf die Anzahl der Experimente normalisiert. Mehrfaches Auftreten während einer Phase wurde nur einmal gewertet.

2.8.2 Patch Clamp Methodik für Sphäroplasten

Die Experimente wurden am planaren Patch Clamp Aufbau Port-a-Patch (Nanion Technologies) durchgeführt.

Elektrophysiologische Salzlösung, intern

300 *mM* KCl

60 *mM* KF

10 *mM* HEPES, pH 7

Elektrophysiologische Salzlösung, extern

350 *mM* KCl

10 *mM* CaCl₂

10 *mM* HEPES, pH 7

Elektrophysiologische Salzlösung mit hohem Calciumgehalt

300 *mM* KCl

40 *mM* CaCl₂

10 *mM* HEPES, pH 7

Die Sphäroplastenpräparation wurde direkt vor Beginn der Messungen mit externer Salzlösung 1:2 verdünnt. NPC-1 Patch Clamp Chips mit einem Widerstand von 10-15 *MΩ* wurden mit internem und externem Puffer befüllt (5 μ l intern, 10 μ l extern) und die Offsetspannung korrigiert. 5 μ l der verdünnten Sphäroplasten Lösung wurden auf die externen Seite des Chips zugegeben, negativer Druck appliziert und erhöht bis ein Sphäroplast auf der Apertur fixiert ist, erkennbar an einem Anstieg des elektrischen Widerstandes. Durch

Abschalten des applizierten Drucks, das Anlegen einer negativen Spannung bis zu -130 mV und die Zugabe von $50\ \mu\text{l}$ Seal Puffer wurde ein Sealwiderstand im Gigaohmbereich erzeugt. Anschließend wurde der externe Puffer vollständig ausgetauscht, das Haltepotential auf -20 mV gesetzt und mit dem Messprotokoll fortgefahren.

2.8.3 Aktivierung mechanosensitiver Ionenkanäle

Bei dem verwendeten planaren System (Port-a-Patch, Nanion) ist die interne Seite des Patch Clamp Chips hermetisch abgeschlossen und schließt nur ein kleines Volumen ein. Damit ist es für die Druckregulation gut geeignet. Zur Aktivierung der mechanosensitiven Kanäle wurde ein spezielles geregeltes Pumpensystem verwendet (Suction Control Pro, Nanion Technologies, Abb. 2.3). Über bestimmte einstellbare Parameter (Toleranzwerte, Geschwindigkeiten) kann ein definiertes Druckprotokoll appliziert und kontrolliert werden (Abb. 2.4).

Zur Charakterisierung von MscL Aktivität wurde folgendes Protokoll entworfen: Bei einer Spannung von -20 mV wurde zunächst ein Druck von -30 mBar (-22 mmHg) angelegt, der in Schritten von 10 mBar bis zu 160 mBar (120 mmHg) stieg. Jeder Schritt hat eine Dauer von 30 Sekunden .

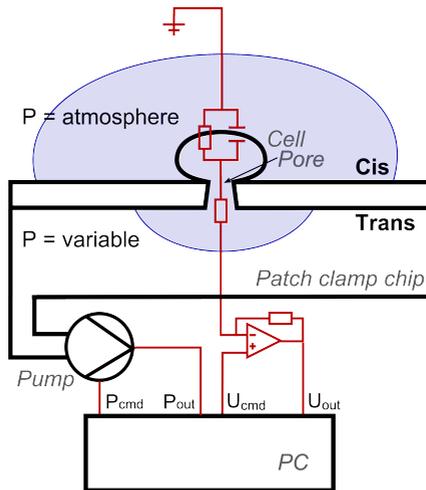


Abbildung 2.3: Automatisierte Druck und Spannungsregelung. Auf der externen und internen Seite des Chips befindet sich jeweils ein Tröpfchen Salzlösung. Auf der Apertur im Borosilikatglas ist ein Sphäroplast fixiert. Das elektronische Ersatzschaltbild von Zelle und Messaufbau ist rot eingezeichnet. Ebenfalls ist die Druckregulierung eingezeichnet. Kommandospannung und -Druck werden als Sollwerte vom PC ausgegeben und die Ist-Werte als Messwerte eingelesen. Die Regelung findet in der Pumpe (Druck) bzw. im Verstärker (Spannung) statt.

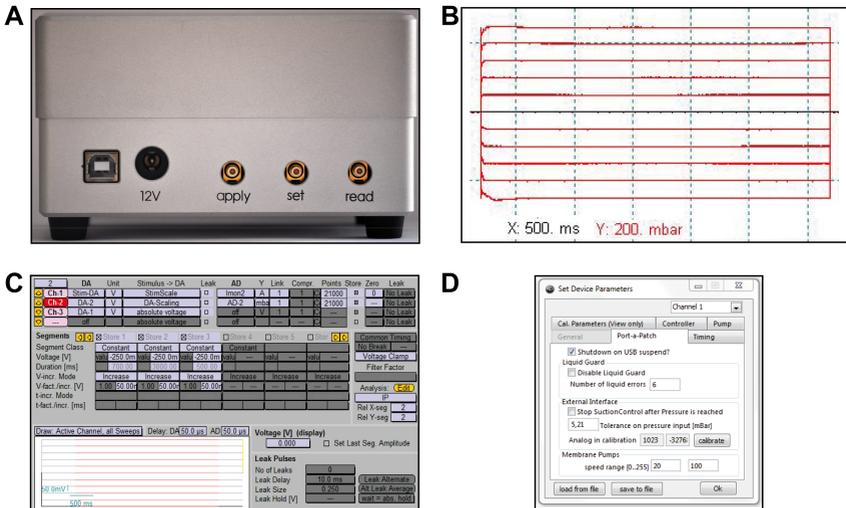


Abbildung 2.4: Computergesteuerte Druckregulation. A: Suction Control Pro, sichtbar sind die Ein- und Ausgänge zur Steuerung. Die Pumpe wird über USB angesprochen oder zur automatischen Druckkontrolle über zwei serielle Eingänge (apply, set). Ein serieller Ausgang dient zum Auslesen des Ist-Wertes. B: Resultierendes Druckprotokoll. Dargestellt ist die Anzeige der realen Ist-Werte. C: Programmierung des Druckprotokolls auf dem Ausgangskanal 2 des HEKA-Verstärkers. Kanal 3 dient zur Programmierung eines parallel ablaufenden Spannungsprotokolls. D: Einstellung der Pumpenparameter wie Toleranzwerte und Arbeitswerte der Membranpumpen.

2.9 SSM Sensorpräparation

Die SSM Experimente wurden am SURFE2R N1 mit den entsprechenden N1 Sensoren (Nanion Technologies), welche eine 3 mm große, elektrisch kontaktierbare Goldoberfläche innerhalb einer Vertiefung enthalten. Die Goldoberfläche wurde durch 30-minütige Inkubation mit einer 0,5 molaren 1-Octadecanthiol Lösung (in Isopropanol) mit einer Thiolschicht überzogen und anschließend mit Isopropanol und Wasser gespült. 7,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DPHPC, Avanti Polar Lipids) wurden in n-Decan gelöst und 1,5 μl als Tröpfchen auf die Goldfläche gesetzt, wo es sich auf der hydrophoben Fläche ausbreitet. Sofort danach wurden 80 μl Ladepuffer vorsichtig in die Vertiefung gegeben.

Die NCX-haltigen Liposomen wurden für 30 Sekunden im Wasserbad mit Ultraschall beschallt und direkt am Anschluss 8 μl langsam durch Unterschichten auf die SSM pipettiert. Anschließend wurden die Sensoren für 1 Stunde bei 2200xg zentrifugiert. Die Sensoren zeigten für einige Tage Aktivität wenn sie bei 4 °C gelagert wurden.

2.10 SSM basierte elektrophysiologische Messungen

Die vorbereiteten Sensoren wurden in die gegen elektrische Einstreuungen abgeschirmte Messkammer des SURFE2R N1 eingesetzt und die schnelle Aktivierung durch Lösungsaustausch mithilfe des integrierten Perfusionssystems durchgeführt. Lösungen werden durch eine Stahlkapillare in die Vertiefung des Sensors pipettiert (ca. 300 μl maximales Volumen), zeitgleich kann über-

schüssige Lösung durch eine zweite Kapillare abgenommen werden. Dies wird ermöglicht durch zwei autonome Pumpen. Mithilfe einer Y-Trennung der zuzuführenden Fluidik können zwei unterschiedliche Lösungen aufgenommen und in schneller Abfolge in einem kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom wieder abgegeben werden.

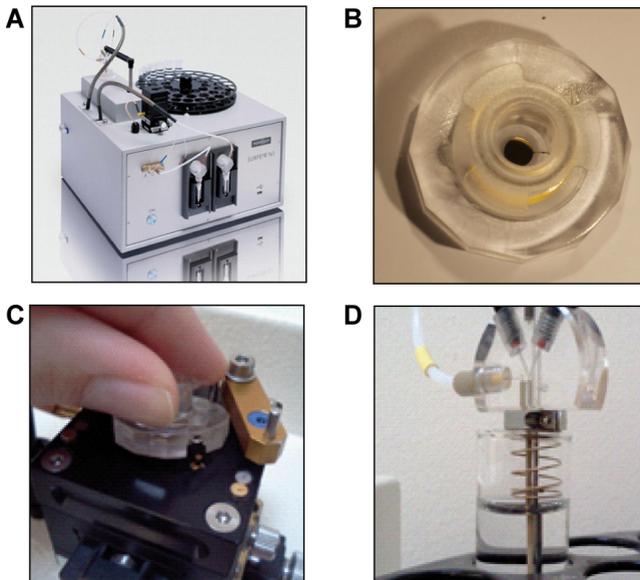


Abbildung 2.5: Hardware SURFE2R N1. A: Ansicht des gesamten Geräts inklusive Robotik, Verstärker und Rechner. Ein Bildschirm zur Anzeige der Software ist nicht abgebildet. B: N1 Sensor. Die SSM wird auf der 3 mm großen, kreisförmigen Goldfläche gebildet, die sich in einer Vertiefung befindet. C: Positionierung des Sensors in der Messkammer. Die Kammer wird anschließend durch einen Metallkappe elektrisch abgeschirmt. D: Pipettierkopf mit Perfusionseinheit. Der Kopf ist an einem robotischen Arm befestigt und kann so verschiedene Positionen zu Aufnahme und Abgabe von Flüssigkeiten anfahren.

Vor jedem Experiment wurden Kapazität und Leitfähigkeit des jeweiligen Sensors bestimmt (Abb. 2.6). Dies erfolgt über einen elektrischen Funktions-

generator, der mit der Stahlkapillare gekoppelt werden kann. Die Sensoren wurden nur für Messungen verwendet, wenn sich die Werte unter 20 pF bzw. 3 nS befanden. Befinden sich die Werte von Kapazität und Leitfähigkeit oberhalb dieser Grenzen, zeigt dies, dass die SSM nicht intakt und damit die elektrische Isolation der Goldoberfläche nicht gegeben ist. Ein großer Offsetstrom und Anfälligkeit für fluidische Artefakte sind die Folge.

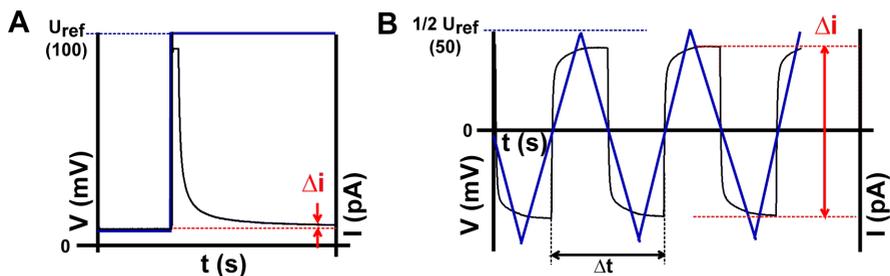


Abbildung 2.6: Bestimmung von Kapazität und Leitfähigkeit der SSM. A: Die Leitfähigkeit wird aus dem Offsetstrom nach einem Spannungssprung von 0 auf 100 mV berechnet. B: Die Kapazität wird aus der Stromantwort auf eine Sägezahnspannung berechnet.

Der Lösungsaustausch durch das schnelle Perfusionssystem zur Aktivierung des Transporters wurde mithilfe der zur Verfügung stehenden Software nach folgendem Muster programmiert: Der Sensor wird zunächst für zwei Sekunden mit einem Kontrollpuffer gespült, um klar definierte Umgebungsbedingungen zu erhalten und die Stromantwort des Transporters zeitlich von mechanischen Störungen beim Anfahren des Perfusionssystems zu trennen. Anschließend erfolgt der Wechsel auf einen aktivierenden Puffer. Mit diesem wird der Sensor wieder zwei Sekunden lang perfundiert. Anschließend wird in einer dritten Phase, wieder zwei Sekunden lang, der Sensor mit Kontrollpuffer gespült. Während dieser Sequenz wird der Stromfluss aufgezeichnet. Anschließend wird der Sensor mit Ladepuffer gewaschen und ein weiterer Aktivierungszyklus kann folgen.

Durch Zugabe des aktivierenden Puffers kann abhängig von der Zusammensetzung der Puffer aufgrund der Stöchiometrie von NCX (3 Na⁺ : 1 Ca²⁺) ein Ein- oder Auswärtsstrom erzeugt werden (I_{Na/Ca}). Das Umkehrpotential des Transporters kann mit $E_{NCX} = 3E_{Na} - 2E_{Ca}$ berechnet werden (Bers und Weber, 2002).

Die Zusammenstellung der Lösungen ist in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst. Um eine definierte Konzentration von freiem Calcium zu erhalten enthielten alle Puffer EGTA. Der Chelator bindet außerdem freies Calcium in den Liposomen. In Anwesenheit von EGTA sind die Signalamplituden um ca. 50% höher. Zur Bestimmung der Calciumaktivität wurde kein Magnesium verwendet, welches um die Bindungsstellen konkurrieren kann. Bei Experimenten zur divalenten Inhibition musste auf EGTA verzichtet werden, welches beispielsweise Cadmium sehr gut bindet und dadurch die Konzentrationen der freien Kationen stark verfälscht. Bei Versuchen zur Selektivität wurden Calcium oder Natrium durch andere Ionen ersetzt.

Calciumaktivierung

Ladepuffer	Kontrollpuffer	Aktivierung
30 mM HEPES	30 mM HEPES	30 mM HEPES
1 mM EGTA	1 mM EGTA	1 mM EGTA
4 mM MgCl ₂	4 mM MgCl ₂	4 mM MgCl ₂
140 mM NaCl	280 Sorbitol	280 mM Sorbitol 100 μM CaCl ₂

Natriumaktivierung

Ladepuffer	Kontrollpuffer	Aktivierung
30 mM HEPES	30 mM HEPES	30 mM HEPES
1 mM EGTA	1 mM EGTA	1 mM EGTA
4 mM MgCl ₂	4 mM MgCl ₂	4 mM MgCl ₂
240 mM Sorbitol	180 mM Sorbitol	180 mM Sorbitol
20 mM CaCl ₂	60 mM CholinCl	50 mM CholinCl 10 mM NaCl

2.11 Datenauswertung

Um schnelle Einzelkanalaktivität auflösen zu können, wurden die Patch Clamp Messungen mit einer Abtastrate von 10 kHz und einem Verstärkungsfaktor von 5 mV/pA durchgeführt. Analysen zu Einzelkanaleigenschaften wurden mit der Software Clampfit (Molekular Devices) ausgeführt. Dazu wurden die Daten mithilfe eines Matlab Skripts entsprechend umformatiert.

Die Maxima von Amplitudenhistogrammen wurden durch Approximation von Gaußfunktionen mithilfe der Methode der kleinsten Quadrate (Algorithmus nach Levenberg-Marquardt) berechnet:

$$f(I) = \sum_{i=1}^n A_i \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_i} \exp\left(-\frac{(I_i - I_{i0})^2}{2\sigma_i^2}\right) \quad (2.4)$$

Zur Analyse der Verweilzeiten wurde eine Ereignis-Suche durchgeführt. Diese wurde mit der Funktion „Single-Channel Search“ in Clampfit ausgeführt, wobei eine Veränderung der Basislinie um bis zu 10% korrigiert und nur Veränderungen über 0,1 ms Dauer eingerechnet wurden. Zur Analyse der Öffnungskinetiken wurde die Dauer der jeweiligen Zustände gegen deren Häufigkeit aufgetragen. Die entstandenen Histogramme wurden durch Exponentialfunktionen approximiert, um die Zeitkonstanten zu erhalten:

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad (2.5)$$

Aus deren Verhältnis lässt sich die Offenwahrscheinlichkeit errechnen:

$$P_o = \frac{\int I_o}{\int I_o + \int I_c} = \frac{\tau_o}{\tau_o + \tau_c} \quad (2.6)$$

Die Messungen sowie die statistische Auswertung der Leitfähigkeiten in Mitoplasten erfolgten blind, die Zuordnung der Mäuse erfolgte erst zu einem späteren Zeitpunkt. Die Analyse wurde unabhängig von zwei Personen durchgeführt. Die statische Signifikanz der Ergebnisse wurde durch Varianzanalyse (ANOVA) abgeschätzt.

Die SURFE2R Rohdaten wurden im ASCII Format exportiert, die Analyse mit IGOR Pro 6 (WaveMetrics, Portland, USA), einem Programm zur wissenschaftlichen Datenanalyse und Grafikbearbeitung, durchgeführt. Die Amplitudenmaxima wurden mithilfe eines integrierten Algorithmus rechnerisch bestimmt. Für Mittelwerte wurden ausschließlich Daten von unterschiedlichen Sensoren verwendet, nie Wiederholungen am gleichen Sensor. Fehlerbalken und -werte repräsentieren immer den Standardfehler.

Affinitäts- und Inhibitionskurven wurden durch Hill-Funktionen approximiert (Formel 2.7).

$$I(c) = \frac{1}{1 + \left(\frac{c}{K_d}\right)^{nH}} \quad (2.7)$$

K_d und IC_{50} -Werte sowie die jeweiligen Fehler wurden aus den individuell bestimmten Werten verschiedener Experimente berechnet. Die Anzahl der Experimente wird als N bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation von mitoBK_{Ca}

3.1.1 Patch Clamp Technik für die innere mitochondriale Membran

Um zu zeigen, dass das Gen KCNMA1 nicht nur für K_{Ca}1.1 aus der Plasmamembran, sondern auch für mitoBK_{Ca} kodiert, wurden die kardialen Mitochondrien von wild-typ und KCNMA1 knock-out Mäusen in Bezug auf ihre elektrophysiologischen Eigenschaften zu verglichen. Dabei lag der Fokus auf Identifizierung und Charakterisierung des putativen mitoBK_{Ca}. Dazu wurden Mitoplasten erzeugt und auf einem planaren Patch Clamp Setup untersucht.

Zur Etablierung der Patch Clamp Messung wurde die Methodik auf Mitoplasten aus HEK293 Zellen angewendet. Mithilfe eines speziell entwickelten automatisierten Protokolls (Kap. 2.8.1), das Spannung und Druck steuert und bei Verwendung von Patch Clamp Chips mit einer Apertur von unter einem Mikrometer, gelang es effizient, die ca. 5 μm großen Mitoplasten zu positionieren und einen hochohmigen Sealwiderstand zu etablieren. Die Ausbildung des Sealwiderstandes erfolgte zügig und konnte durch die Zugabe einer calciumhaltigen Lösung (30 mM) und das Anlegen eines negativen elektrischen Potentials bis zu -130 mV unterstützt werden.

Bei Verwendung physiologischer Salzlösungen kann eine Mischung aus ma-

kroskopischen und einer Vielzahl von Einzelkanalströmen beobachtet werden, wobei die Stromamplitude nicht linear mit positivem Potential ansteigt (Abb. 3.1). Ein großer Anteil des makroskopischen Ionenstroms konnte auf eine Chloridleitfähigkeit zurückgeführt werden. Bei Verwendung einer externen Agar-Salzbrücke wurde der Chloridgehalt der externen Elektrolytlösung bei gleichbleibendem Elektrodenpotential variiert. In chloridfreier Lösung konnte ein Großteil des makroskopischen Stroms unterdrückt werden. Bei positivem Potential strömt also Chlorid, getrieben vom elektrochemischen Gradienten, in das Mitochondrium ein und verursacht dadurch einen Stromfluss mit positivem Vorzeichen. Als Hauptquelle des endogenen mitochondrialen Chloridstroms konnte der Anionenkanal IMAC (Inner Mitochondrial Anion Conductance) identifiziert werden. IMAC ist der erste in der IMM identifizierte Ionenkanal und ist daher verhältnismäßig gut beschrieben (Szabo und Zoratti, 2014). Der beobachtete Chloridstrom wurde durch die Applikation von Propranolol inhibiert, dessen betarezeptorunabhängige Wirkung auf IMAC bekannt ist (Powers und Beavis, 1991). Außerdem wurde eine ebenfalls propranolol-sensitive Einzelkanalaktivität von ca. 100 pS beobachtet (Abb. 3.2). Diese Leitfähigkeit entspricht gut der publizierten IMAC-Leitfähigkeit von 108 pS (Borecky u. a., 1997).

Zur Gewinnung von Mitoplasten aus dem Herzmuskel wurden durch enzymatischen Verdau zunächst vitale Kardiomyozyten aus Mäuseherzen gewonnen. Diese wurden dann nach dem bereits etabliertem Protokoll mit minimalen Anpassungen weiterverarbeitet zu Mitoplasten. Die Qualität der erzeugten Mitoplastenpräparation wurde optisch geprüft. Dazu wurde die Präparation verdünnt und mittels Poly-L-Lysin an Objektträger adhärirt. Die Mitoplasten wurden vorher mit MitoTracker Red (Life Technologies) eingefärbt. Die Konfokalaufnahmen zeigen die Anwesenheit von Mitochondrien sowie Mitoplasten. Die Mitoplasten haben eine Größe von 2-5 μM , oft ist die äußere Membran als sogenannte „Cap“ noch mit dem Mitoplasten verbunden (Abb.

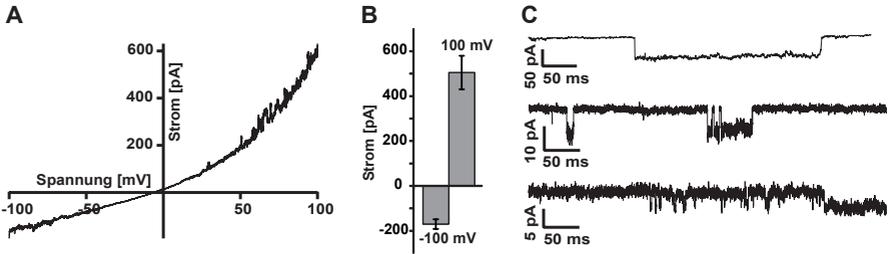


Abbildung 3.1: Charakteristische Ströme in Mitoplasten aus HEK293 Zellen in NaCl, KCl und CaCl₂ haltiger Salzlösung. A: Repräsentative Stromantwort auf eine Spannungsrampe. Einzelkanalströme sind auf einen makroskopischen Stromfluss aufgeprägt. Im Bereich positiven Potentials nimmt sowohl die Öffnungswahrscheinlichkeit der Einzelkanäle als auch der makroskopische Strom nichtlinear zu. Das Umkehrpotential befindet sich im Bereich von 0 mV. B: Durchschnittliche Stromamplitude bei 100 mV und -100 mV. C: Verschiedene Einzelkanal Aktivitäten in nativen Mitoplasten. Kanalöffnung einzelner Proteine bei +80 mV.

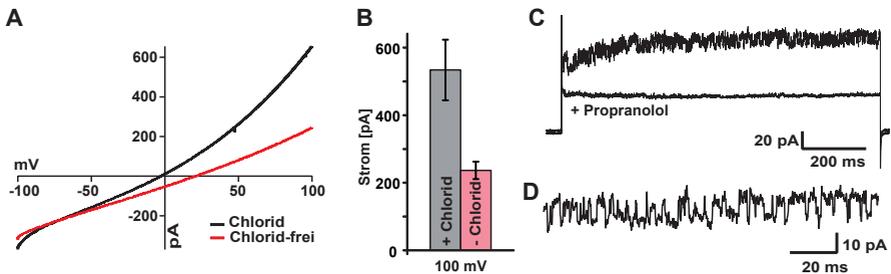


Abbildung 3.2: Chloridströme in HEK293 Mitoplasten. A: Variation der Chloridkonzentration der externen Salzlösung. Als Ersatzanion dient MSA (Methansulfonsäure), das Elektrodenpotential wird durch eine Agarbrücke mit 3 M KCl konstant gehalten. Es kann eine deutliche Reduktion des Ionenstroms im Bereich positiven Potentials, sowie eine Verschiebung des Umkehrpotentials nach rechts beobachtet werden. B: Quantifizierung des durchschnittlichen Chloridstroms bei 100 mV. C: Ein makroskopischer Ionenstrom mit aufgeprägten Einzelkanalöffnungen bei +80 mV kann durch Zugabe von Propranolol signifikant inhibiert werden. D: Vergrößerte Ansicht der Einzelkanalaktivität. Der Kanal zeigt eine Leitfähigkeit von ca. 100 pS bei +80 mV.

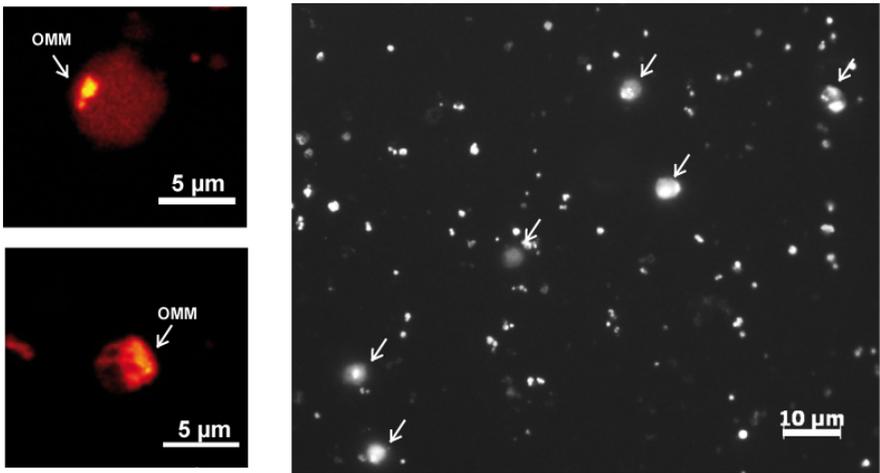


Abbildung 3.3: Mitoplastenpräparation aus murinen Kardiomyocyten, Konfokalaufnahme, Färbung mit MitoTracker Red. Nach Verdünnung 1:100, Fixierung an Objektträger durch Poly-L-Lysin. Es ist eine Mischung aus Mitochondrien und Mitoplasten zu erkennen, Mitoplasten sind mit einem Pfeil markiert. Zelltrümmer finden sich nicht mehr. Links sind zwei individuelle Mitoplasten unterschiedlicher Größe dargestellt. Die OMM ist an der größeren Helligkeit erkennbar, sie ist noch als sogenannte „Cap“ mit dem Mitoplasten verbunden.

3.3) . Dieses Erscheinungsbild entspricht publizierten Beschreibungen (Kirichok u. a., 2004).

3.1.2 Patch Clamp Technik für die äußere mitochondriale Membran

Da in der Mitoplastenpräparation noch intakte Mitochondrien vorhanden sind, und OMM auch als „Cap“ mit der IMM verbunden ist, wurden zur Abgrenzung der elektrophysiologischen Charakteristik von IMM und OMM einige qualitative Experimente an der OMM durchgeführt. Dazu wurden intakte Mitochondrien während der Liposomenbildung durch Elektroformation zu den Lipiden gegeben. Damit wurde erreicht, dass einige Mitochondrien in die sich bildende Lipiddoppelschicht integriert werden. Aus den Liposomen wurden durch Spreading Bilayer generiert, in welchen Einzelkanalaktivitäten beobachtet werden können (Abb. 3.4). In typischer physiologischer Lösung (Ringer) konnten sehr charakteristische Leitfähigkeiten beobachtet werden, die sich deutlich von der Aktivität der Mitoplasten unterschieden. Neben der Öffnung sehr großer Poren wurde Aktivität eines spannungssensitiven, nichtselektiven, Kanals mit hoher Leitfähigkeit und Aktivität zwischen ca. -40 und 40 mV beobachtet. Diese Charakteristik ist typisch für VDAC (Voltage Dependent Anion Conductance), ein gut beschriebenes Porin der OMM (Blachly-Dyson und Forte, 2001).

3.1.3 Identifizierung von mitoBK_{Ca}

Die Vorversuche an Mitoplasten aus HEK293 Zellen hatten gezeigt, dass große und vielfältige endogene Ionenströme in der IMM existieren. Es mussten da-

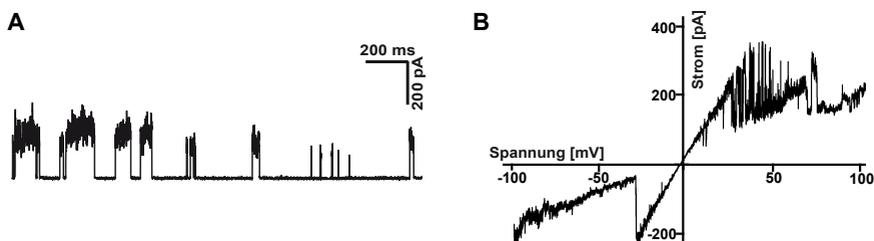


Abbildung 3.4: Typische Aktivitäten in OMM. Ganze Mitochondrien wurden in Bilayer integriert, die Kanalaktivität in üblichen physiologischen Puffern beobachtet. A: Öffnung von hohen Leitfähigkeiten, möglicherweise Poren. B: Aktivität eines spannungssensitiven, nichtselektiven Kanals mit hoher Leitfähigkeit und Aktivität zwischen ca -40 und 40 mV . Diese Charakteristik ist typisch für VDAC. Eine negative Stromamplitude entspricht einem Einwärtsstrom positiver Ladungsträger.

her spezifische Bedingungen geschaffen werden, die die Isolation eines potentiellen mitoBK_{Ca}-Stromes ermöglichen. In den Elektrolytlösungen wurde auf alle Kationen außer Kalium verzichtet, die Osmolarität wurde durch Sorbitol im physiologischen Bereich gehalten. Chlorid konnte durch Gluconat substituiert werden. Die Funktionsfähigkeit der externen Silberchloridelektroden mit konstantem Elektrodenpotential ermöglichte eine Agar-Salz-Brücke, intern wurde eine minimale Menge Chlorid verwendet (10 mM). Zur Aktivierung von mitoBK_{Ca} wurde der externen Lösung (entspricht dem Zelllumen) 1 mM Calciumgluconat zugesetzt. Unter diesen Bedingungen kann bei positivem Potential (intern) ausschließlich ein Kaliumausstrom auftreten. Zur weiteren Reduktion potentiell auftretender Leitfähigkeiten wurden bekannte Inhibitoren mitochondrialer Ionenkanäle und Poren eingesetzt. Zur Aktivierung von mitoBK_{Ca} wurde ein positives Potential von 80 mV appliziert. Da keine oder nur eine geringe Expressierung von mitoBK_{Ca} in HEK293 Mitochondrien zu erwarten ist, wurden zur Identifikation von mitoBK_{Ca} Mitoplasten aus Myocardzellen von wild-typ Mäusen (BK+/+) verwendet.

Unter den beschriebenen Bedingungen traten keine großen makroskopischen Ströme mehr auf, sondern es wurden ausschließlich Einzelkanalaktivitäten auf einem konstanten Hintergrundstrom von 10 bis 100 pA beobachtet. Auch die Anzahl der unterschiedlichen auftretenden Leitfähigkeiten wurde deutlich reduziert. Trotz der restriktiven Bedingung traten aber noch immer mehrere verschiedene Leitfähigkeiten auf. Zeitgleiches Auftreten verschiedener Leitfähigkeiten, sowie mehrfache Kanalöffnungen waren sehr selten. Phasen vollständiger Inaktivität konnten jedoch öfter beobachtet werden. Zur genaueren Charakterisierung der auftretenden Leitfähigkeiten mussten daher lange Zeitintervalle analysiert werden. Dies wurde ermöglicht durch Verwendung eines repetitiven Spannungsprotokolls, bei dem Aktivierungsphasen auf 80 mV mit Regenerationspausen bei -50 mV alternieren. Auf diese Weise blieb der Sealwiderstand für mindestens 10 Minuten stabil.

Aufgrund der gewählten Bedingungen muss es sich bei den auftretenden Leitfähigkeiten um Kaliumströme handeln, welche entweder durch kaliumspezifische oder unspezifische Kanäle erzeugt werden. Es konnten insgesamt vier unterschiedlich große Leitfähigkeiten identifiziert werden. Diese betragen bei 80 mV 60 pS , 120 pS , 190 pS und ca. 370 pS (Abb. 3.5). Die Leitfähigkeit von ca. 370 pS zeigte die größte Streuung bezüglich der Amplitude des Ionenstroms.

Die beschriebenen Eigenschaften von $K_{Ca1.1}$ aus der Plasmamembran sind eine selektive Kaliumleitfähigkeit von 150 bis 300 pS sowie Aktivität bei positivem Potential in Anwesenheit von Calcium im niedrigen mikromolaren Bereich. Diese Eigenschaften treffen auf die beobachtete Leitfähigkeit von 190 pS zu, weshalb sie potentiell durch den gesuchten Kanal *mitoBK_{Ca}* erzeugt werden könnte.

Um die Hypothese zu bestätigen, dass es sich bei der 190 pS Leitfähigkeit um

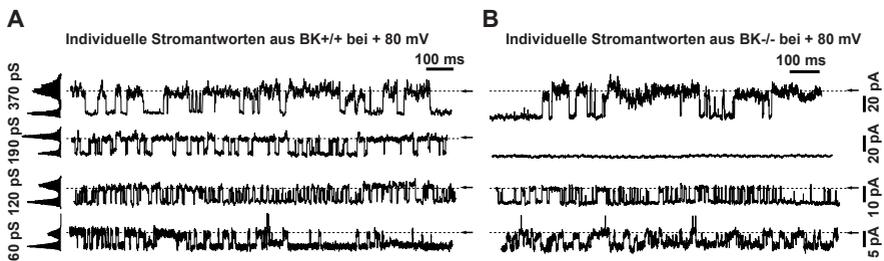


Abbildung 3.5: Beobachtete Einzelkanalleitfähigkeiten in Mitoplasten. Salzlösungen und Potential sind so gewählt, dass ausschließlich Kaliumströme auftreten können, bekannte Inhibitoren mitochondrialer Kanäle wurden eingesetzt. Es traten Leitfähigkeiten der Größe 60, 120, 190 und 370 pS auf. Der geöffnete Zustand ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. A: Repräsentative Aufnahmen der Leitfähigkeiten in wild-typ Mäusen. Links sind die aus dem Amplitudenhistogramm berechnete Leitfähigkeit sowie das Histogramm selbst dargestellt. B: Repräsentative Daten aus BK -/- Mäusen. Die Leitfähigkeit 190 pS trat hier nicht auf.

mitoBK_{Ca} handelt, wurde das Auftreten der vier Leitfähigkeiten in BK+/+ und BK -/- statistisch analysiert und verglichen. Zudem wurde der Einfluss des BK-Aktivators NS11021 sowie des -Inhibitors Paxillin auf die 190 pS Leitfähigkeit untersucht. Analysiert wurden pro Mitoplast je 9 Minuten Messzeit mit obenstehend beschriebenem Spannungsprotokoll. Jedes Experiment wurde in drei Phasen von je drei Minuten Dauer unterteilt. Nach einer Kontrollphase wurde der BK-Aktivator NS11021 zugegeben, nach weiteren drei Minuten der Inhibitor Paxillin. Bei Einbezug der gesamten Messzeit zeigte sich deutlich, dass der Kaliumkanal mit Leitfähigkeit 190 pS bei BK-/- Mäusen nicht auftrat. Die Leitfähigkeit 120 pS trat unverändert mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 80% auf, bei der Leitfähigkeit 60 pS war eine deutliche Steigerung von 35% auf 70% zu beobachten. Die statistische Analyse der drei Messphasen (Kontrolle/NS11021/Paxillin) zeigte, dass die Häufigkeit des Auftretens von 190 pS in Anwesenheit von NS11021 signifikant steigt und durch Paxillin sinkt (Abb. 3.6).

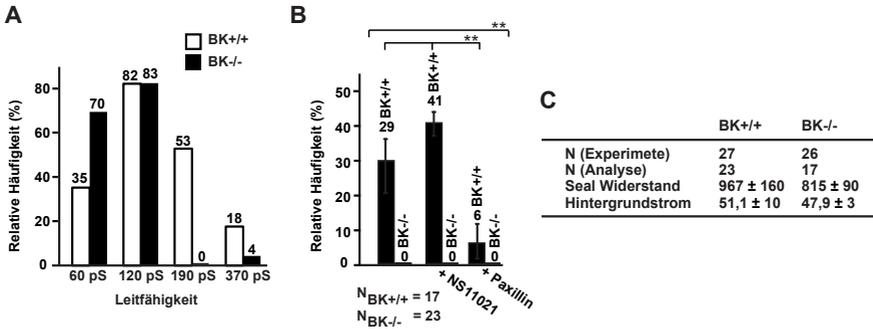


Abbildung 3.6: Statistische Analyse der Auftretswahrscheinlichkeit der vier identifizierten Leitfähigkeiten in Mitoplasten. A: Vergleich der vier Leitfähigkeiten in BK+/+ und BK-/-. 60 pS tritt in BK-/– signifikant häufiger auf, 120 pS ist identisch, 190 pS tritt in BK-/– nicht auf. 370 pS tritt zu selten auf, um eine signifikante Aussage zu treffen. B: Detailanalyse der Leitfähigkeit 190 pS unter verschiedenen Bedingungen. NS11021 erhöht die Auftretswahrscheinlichkeit um mehr als 10%, Paxillin senkt sie um über 20%. C: Statistik zu den Messungen.

Die Abwesenheit der 190 pS Leitfähigkeit in BK-/– Mäusen sowie die Reaktionen auf NS11021 und Paxillin unterstützen die Hypothese, dass es sich hierbei um den mitochondrialen Kaliumkanal mitoBK_{Ca} handelt. Die Einzelkanalcharakteristik des Kanals während aktiver Phasen wurde daher genauer analysiert (Abb. 3.7). Die Berechnung der Leitfähigkeit wurde durch die Idealisierung der Amplituden-Verteilung mithilfe einer Gaußfunktion verbessert. Es ergab sich einen Wert von 192 pS bei 80 mV. Diese Berechnung wurde bei unterschiedlichen Potentialen durchgeführt und zeigte ein lineares Strom-Spannungs-Verhältnis im Bereich von 20 bis 100 mV mit einer Steigung von 190 pS. Durch Analyse der Öffnungsdauer konnten die Zeitkonstanten τ der Verweilzeiten im offenen und geschlossenen Zustand bestimmt werden. Diese betragen 2,45 ms für den geschlossenen bzw. 9,23 ms für geöffneten Zustand. Dabei bezeichnet τ den Kehrwert der Zeitkonstanten k . k_o beschreibt die Übergangsgeschwindigkeit vom geschlossenen in den offenen Zustand, k_c entsprechend vom offenen in den geschlossenen.

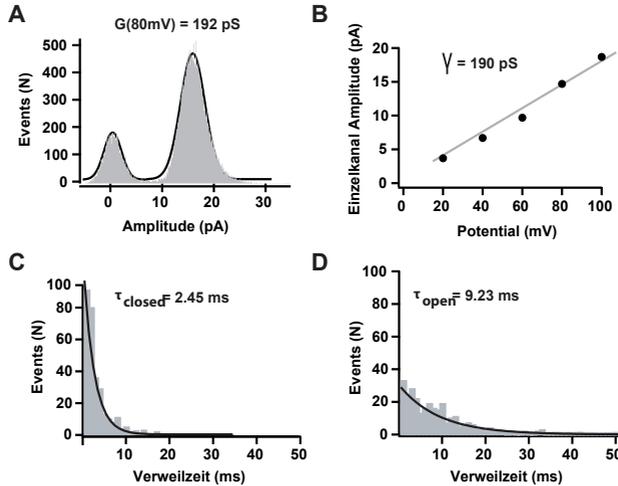


Abbildung 3.7: Detailanalyse der Einzelkanalcharakteristika von mitoBK_{Ca} in Phasen von Kanalaktivität. A: Berechnung der Leitfähigkeit bei 80 mV. Das Amplitudenhistogramm der Stromspur wird durch Gaußverteilungen approximiert und aus der Differenz der Maxima die Amplitude der Einzelkanalleitfähigkeit errechnet. B: Berechnung der Leitfähigkeit bei unterschiedlichen Potentialen zeigt einen linearen Zusammenhang mit einer Steigung von 190 pS. C+D: Berechnung der Verweilzeiten des geschlossenen (C) und offenen (D) Zustandes ergeben Zeitkonstanten von 2,45 und 9,23 ms. Daraus errechnet sich eine Wahrscheinlichkeit von 0,79, dass der Kanal sich bei 80 mV im offenen Zustand befindet.

3.2 Bakterielle mechanosensitive Ionenkanäle

3.2.1 MscL in künstlichen Bilayermembranen

Um neue Methodiken für die elektrophysiologische Untersuchung bakterieller mechanosensitiver Ionenkanäle zu etablieren, wurde zunächst ein Ansatz verfolgt, der künstliche Bilayermembranen nutzen soll. Weil dies auf konventionellen Bilayer setups nicht möglich ist, wurden lösungsmittelfreie Bilayermembranen durch „Spreading“ auf einem Patch Clamp Chip erzeugt.

In Detergenz gelöstes MscL aus *E. coli* wurde in GUVs rekonstituiert (Kap. 2.6). Die proteinhaltigen GUVs wurden auf einen Patch Clamp Chip mit dem Widerstand 3-5 $M\Omega$, entsprechend eine Apertur von ca. 1 μm , gegeben und mit sehr leichtem Unterdruck ein individueller Vesikel angesaugt, der, sobald er in Kontakt mit der Glasoberfläche kommt, aufplatzt und eine Lipid Doppelschicht bildet. Die externe Salzlösung wurde ausgetauscht, sobald sich ein stabiles Bilayer mit einem elektrischen Widerstand von 5-20 $G\Omega$ gebildet hat, um spontane Integrationen weiterer GUVs in das bestehende Bilayer zu verhindern, da dies zu Unstabilität und Schwankungen des Offsetstroms führt.

Anschließend wurde, entweder manuell oder automatisiert, ein ansteigender negativer Druck appliziert, bis Kanalaktivität auftrat. Es konnte ab ca. 90 mBar Einzelkanal Aktivität mit typischer MscL-Charakteristik beobachtet werden (Abb. 3.8). Die Kanalöffnungen hatten eine Amplitude von ca. 60 pA bei einer Spannung von 20 mV , eine schnelle Kinetik und zeigten ausschließlich eine ohmsche Abhängigkeit vom angelegten Potential.

Zur detaillierteren Charakterisierung der Leitfähigkeit wurde ein spezielles

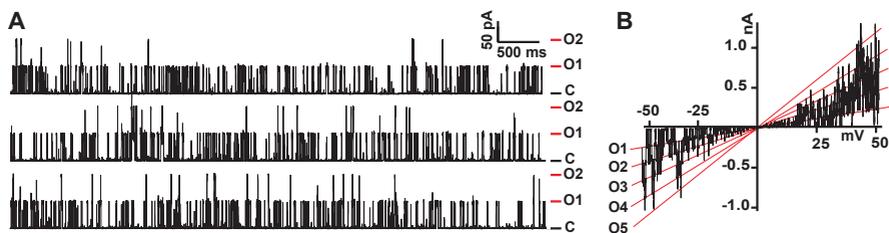


Abbildung 3.8: Typische Aktivität von MscL, gemessen in einem künstlichen Bilayer auf einem planaren Patch Clamp System. A: Aktivität bei 20 mV und -100 mBar. Die Zustände geschlossen („c“) und offen („o1“ und „o2“) sind markiert. B: Spannungsrampe von -50 bis 50 mV bei -100 mBar. MscL zeigt eine rein ohmsche Spannungsabhängigkeit. Bis zu fünf Kanäle sind gleichzeitig im offenen Zustand.

Messprotokoll verwendet, welches Druck und Potential autonom steuert. Dabei wird der Druck schrittweise von -30 mBar (-22 mmHg) bis zu 160 mBar (120 mmHg) erhöht. MscL Kanalaktivitäten traten ab 70 mmHg (90 mBar) auf, in der Regel konnten ein bis vier Kanäle beobachtet werden. In 350 mM KCl auf beiden Seiten und bei einer Membranspannung von 20 mV, wurde eine Einzelkanalleitfähigkeit von 3,6 nS bestimmt. Die Wahrscheinlichkeit der Kanalöffnung abhängig vom Druck wurde mithilfe einer Boltzmannverteilung bestimmt (Hamill und Martinac, 2001). $P_{1/2}$ ist der Punkt auf der Funktion, an dem MscL 50% der Zeit geöffnet ist. Dieser Wert wurde bei $77,5 \pm 2,7$ mBar (103,3 mmHg) erreicht. Für die Drucksensitivität, die als der Kehrwert der Steigung der Boltzmannfunktion ($1/a$) definiert ist, ergab sich ein Wert von $4,78 \pm 1,34$ mBar pro e-fachem Anstieg der Öffnungswahrscheinlichkeit. Dies stimmt mit publizierten Werten überein (Hase u. a., 1995; Cruickshank u. a., 1997). Die Verteilung der Verweilzeit im offenen Zustand wurde durch eine logarithmische Wahrscheinlichkeitsfunktion mit drei Termen beschrieben, dabei ergaben sich Zeitkonstanten von 4,3 und 16,8 sowie eine < 1 (Abb. 3.9).

Die erhobenen Daten zeigen, dass diese Form künstlicher Lipid Bilayer stabil

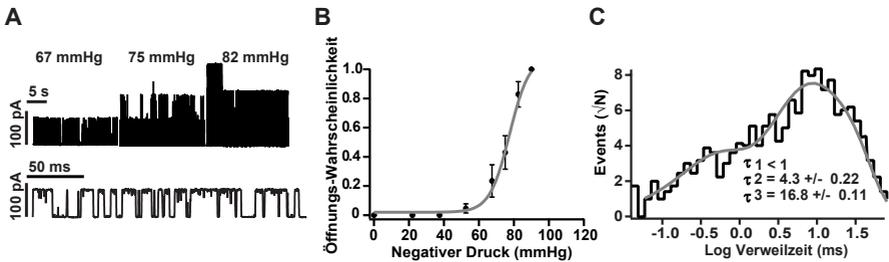


Abbildung 3.9: MscL in Bilayern, gemessen auf einem planaren Patch Clamp System. A: Individuelle Einzelkanalströme. Oben dargestellt sind verschiedene Messphasen bei variierendem Unterdruck, unten ein vergrößerter Ausschnitt bei 67 mmHg. B: Berechnung der Öffnungswahrscheinlichkeiten bei variierendem Druck und anschließende Approximation durch eine Boltzmannfunktion zeigen die Druckabhängigkeit des Ionenkanals. Es ergibt sich eine Öffnungswahrscheinlichkeit von 50% bei 77,5 mmHg. C: Analyse der Verweilzeit im offenen Zustand. Aufgetragen ist der Logarithmus der Öffnungsdauer gegen die Wurzel der Anzahl der Ereignisse. In dieser üblichen Darstellungsart ist erkennbar, dass es zwei Hauptmaxima bei 4,3 und 16,8 ms gibt.

genug ist, um mechanosensitive Ströme zu stimulieren. MscL zeigt außerdem in dem künstlichen System eine physiologisch sinnvolle Charakteristik. Um die Daten weiter zu validieren, wurden vergleichbare Messungen an einem konventionellen Patch Clamp Aufbau von der Universität Groningen durchgeführt. An konventionellen Aufbauten können keine klassischen Bilayer untersucht werden, jedoch ist es möglich, Lipidvesikel mit einer Patch Pipette, ähnlich wie nicht adhärenente Zellen, zu fixieren. Es kann anschließend eine Art „inside out“ Konfiguration etabliert werden. Diese Methodik erfordert viel Geschick, ist jedoch der hier entwickelten am ähnlichsten und daher als Vergleich geeignet. Die elektrolytischen Salzlösungen mussten für diese Experimente anders gewählt werden, da hier eine größere Menge zweiwertiger Kationen notwendig ist, um stabile Sealwiderstände zu erhalten. Es wurden die gleichen Versuche durchgeführt wie bereits am planaren System, jedoch kann hier kein automatisiertes Druckprotokoll angewendet werden, sondern

der Druck wird manuell eingestellt. Wegen der dadurch entstehenden Abweichung ergibt sich ein Fehler in X-Richtung. Typische Sealwiderstände reichen hier von 2 bis 5 $G\Omega$, MscL wird aktiv ab ca. 90 mmHg. Es wurde eine Leitfähigkeit von 3,2 nS in Anwesenheit von 200 mM KCl, 90 mM $MgCl_2$ und 10 mM $CaCl_2$ auf beiden Seiten beobachtet. $P_{1/2}$ betrug $104,8 \pm 0,3$ mmHg, die Drucksensitivität $5,3 \pm 1,29$ mmHg (Abb. 3.10). Diese Charakteristika haben eine hohe Ähnlichkeit mit den zuvor bestimmten Werten.

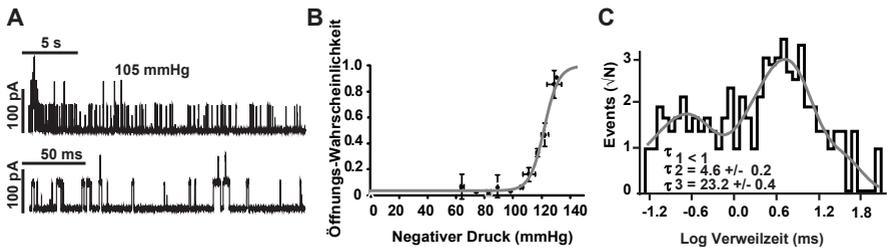


Abbildung 3.10: MscL in Liposomen, gemessen an einem konventionellen Patch Clamp Aufbau. A: Repräsentative Aufnahme von Einzelkanalaktivität bei 105 mmHg. B: Öffnungswahrscheinlichkeit als Funktion des applizierten Drucks, $P_{1/2}$ betrug $104,8 \pm 0,3$ mmHg C: Analyse der Verweilzeit im offenen Zustand.

3.2.2 Endogene Ionenströme in Sphäroplasten

Die Messungen von MscL in künstlichen Bilayern konnten zeigen, dass die Aktivierung mechanosensitiver Ionenkanäle auf einem planaren Patch Clamp Aufbau vergleichbar ist mit konventionellen Patch Clamp Setups. Aufbauend darauf wurde untersucht, ob eine ähnliche Methodik bei nativer bakterieller Membran angewendet werden kann. Dazu wurden Sphäroplasten aus der inneren Membran von *E. coli* generiert und diese elektrophysiologisch, mit besonderem Augenmerk auf die mechanosensitiven Kanäle MscS und MscL, untersucht.

Durch Adaption bekannter Protokolle gelang die Präparation von Sphäroplasten aus *E. coli* (Abb. 3.11). Das kritische Längenwachstum durch Cefalexin zeigte sich stark abhängig von Alter und Bakterienstamm sowie der Wachstumsphase. Unter idealen Bedingungen konnte innerhalb einer Stunde eine Länge von ca. 50 μm erreicht werden. Durch längere Lagerung bei 4°C, sowie einer Behandlungsdauer von über einer Stunde, ging die Wirksamkeit verloren und es bildeten sich wieder einzelne Bakterienzellen. Auch der Verdau der Zellwand durch Lysozym stellte sich als sehr anfällig gegenüber bestimmten Faktoren heraus. Alter, Wachstumsphase und Dichte der Kultur sowie einige notwendige anwesende Chemikalien hatten einen wesentlichen Einfluss. Daraus ergeben sich auch einige nachteilige Wechselwirkungen. So ist beispielsweise sowohl die Wirksamkeit von Cefalexin als auch von Lysozym in der frühen exponentiellen Wachstumsphase am höchsten. Ist eine Induktion des zu exprimierenden Produkts notwendig, verschiebt sich die Lysozymbehandlung im zeitlichen Ablauf noch weiter nach hinten und ist nur noch wenig effektiv. Weiterhin besteht eine Wechselwirkung zwischen DNase, die notwendig ist, um eine Verklumpung der Präparation durch austretende DNA zu verhindern, und Lysozym. Zu hohe Konzentrationen der DNase inhibieren die Wirkung von Lysozym, ein Optimales Verhältnis muss gefunden werden. Es zeigte sich jedoch auch eine starke Abhängigkeit der Cefalexin- und Verdau-Phase vom exprimierten Produkt. Das heißt für jeden Anwendungsfall muss die Optimierung des Präparationsprotokolls erneuert werden. Die Qualität der Präparation wurde durch Phasenkontrast-Mikroskopie ermittelt. Hier konnte beobachtet werden, dass die Bakterien durch Cefalexin bis zu 50 μm lang werden können und anschließend nach dem Verdau der Zellwand Sphäroplasten von ca 2 bis 5 μm Durchmesser bilden.

Ein Protokoll zum Positionieren der Sphäroplasten auf dem Patch Clamp Chip und etablieren des Seal Widerstandes wurde entwickelt, wobei vor allem eine geeignete Verdünnung der viskosen Präparation sowie das sofortige

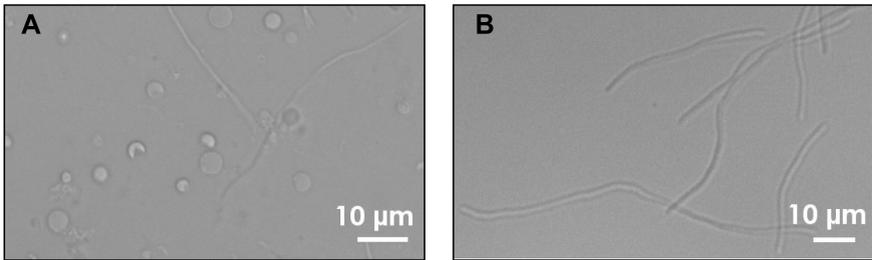


Abbildung 3.11: Präparation von Sphäroplasten aus *E. coli*. A: Sphäroplasten nach Verdau der Zellwand zwischen 2 und 5 μM Durchmesser. B: Filamente aus *E. coli*, erzeugt durch 1-stündige Cephalalexinbehandlung.

tige Nachlassen des Ansaugdrucks nach Fixierung eines Sphäroplasten entscheidend waren. Im Gegensatz zu Mitoplasten musste das Haltepotential im moderaten negativen Bereich gewählt werden, zu negative Potentiale verursachten starke Fluktuationen des Basisstroms bis hin zum Kollabieren des Sealwiderstandes. Unter diesen Bedingungen konnten stabile Sealwiderstände von 800 $M\Omega$ bis 1 $G\Omega$ etabliert werden, die für ca. 10 Minuten stabil waren. Die Kapazitäten bewegten sich, wie bei Mitoplasten, im Bereich von 1 pF .

Es wurden zunächst endogene Ionenströme aufgezeichnet (Abb. 3.12). Dabei zeigte sich ein auffälliges, rektifizierendes Strom-Spannungs Verhalten. Bei positivem Potential ist eine hohe Stromamplitude von bis zu mehreren Nanoampere zu beobachten. Wegen der verwendeten gemischten Salzlösungen kann es sich dabei um einen Chlorideinstrom, einen Kalium- oder unspezifischen Kationenausstrom handeln.

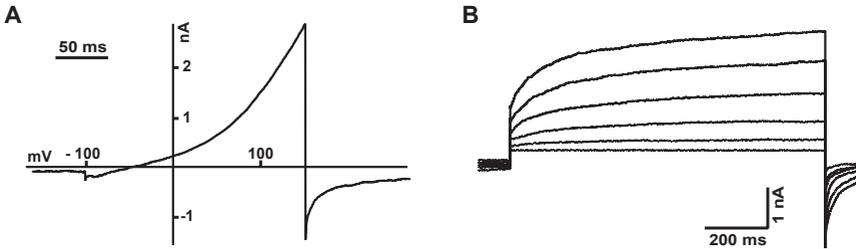


Abbildung 3.12: Endogene Ionenströme in Sphäroplasten. Es wird ein typischer rektifizierender Ionenstrom bei positivem Potential beobachtet.

3.2.3 Mechanosensitive Ionenströme in Sphäroplasten

E. coli besitzt mehrere endogene mechanosensitive Ionenkanäle, darunter MscS und MscL. Der verwendete *E. coli* Stamm besitzt kein natives MscL, MscS ist jedoch vorhanden. MscL wird in den Modellorganismus wieder künstlich eingebaut, um eine höhere Expressionsrate zu erreichen und, Mutanten des Kanals untersuchen zu können. MscS wird bereits bei niedrigem Druck aktiv, inaktiviert aber bei längerem Anhalten des Drucks, MscL wird erst bei hohen Membranspannungen aktiv.

Sowohl MscS als auch MscL konnten in den Sphäroplasten beobachtet werden. Bei langsamer Verstärkung des negativen Drucks zeigt sich eine charakteristische Abfolge: Nachdem zuerst keine Kanalaktivitäten vorhanden sind, zeigen sich ab ca. -50 mBar die ersten MscS Aktivitäten. Bei weiterer Verstärkung des Drucks wird MscS zunächst aktiver, aber schließlich durch den anhaltenden Druck inaktiviert. Wird der Druck noch weiter erhöht, zeigt auch MscL Aktivität. Um die MscL Aktivität charakterisieren zu können, muss MscS vollständig inaktiviert sein, sonst ist keine statistische Analyse möglich (Abb. 3.13)

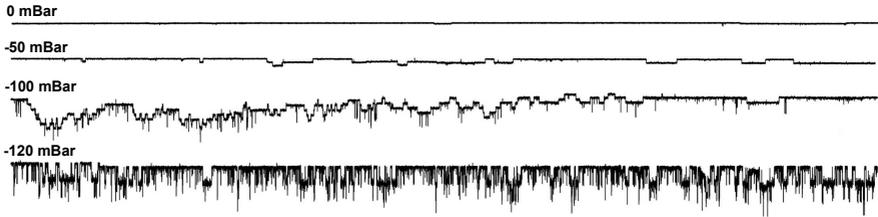


Abbildung 3.13: Die verschiedenen typischen Phasen bei stufenweiser Erhöhung des Drucks auf einen Sphäroplasten anhand eines individuellen Beispiels. Ab -50 mBar zeigt sich erste Aktivität von MscS, die sich steigert bis -100 mBar. Bei diesem Druck sind hier schließlich mindestens 7 Proteine zugleich aktiv, welche dann aber langsam inaktivieren. Bei 120 mBar wird MscL aktiv.

Der native MscS Kanal zeigte unter den gewählten Bedingungen eine Leitfähigkeit von 0,8 nS, die mittlere Verweilzeit der offenen Zustände bewegen sich im Rahmen von über 10 ms (Abb. 3.14). Relevant für die Untersuchung des heterogen exprimierten MscL ist vor allem die Inaktivierung von MscS. Dies geschieht ab ca. 90 mBar und dauert oft mehrere Minuten.

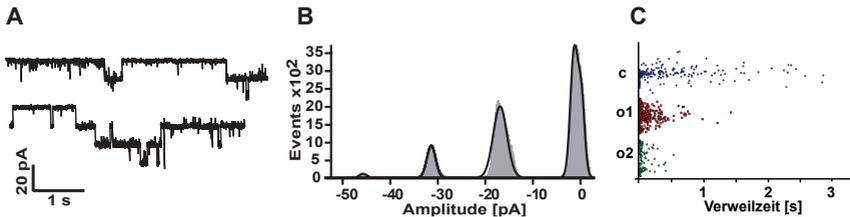


Abbildung 3.14: Charakteristik von nativem MscS. A: Rohströme aus *E. coli* Sphäroplasten. B: Amplitudenhistogramm zeigt vier verschiedene Niveaus, die vermutlich vier offenen Proteinen entsprechen. C: Analyse der Verweilzeit in verschiedenen Niveaus. MscS zeigt eine langsame Charakteristik, die Verweilzeiten liegen im Sekundenbereich.

Nach Inaktivierung von MscS konnte MscL wie in Bilyern charakterisiert werden. Als wichtiger Vergleichswert, der von der Größe und Geometrie des Systems unabhängig ist, dient das Verhältnis zwischen Aktivierungsdruck

von MscS und MscL, welches hier $1,8 \pm 0,4$ betrug. Dies ist ein Wert im typischen Bereich. Die Leitfähigkeit von MscL betrug unter den gewählten Bedingungen $3,2 \text{ nS}$, $P_{1/2}$ $106,6 \pm 6 \text{ mmHg}$, die Drucksensitivität $4,81 \pm 2,34$. Außerdem wurde die Kinetik wie zuvor durch Analyse der Verweilzeiten untersucht (Abb. 3.15).

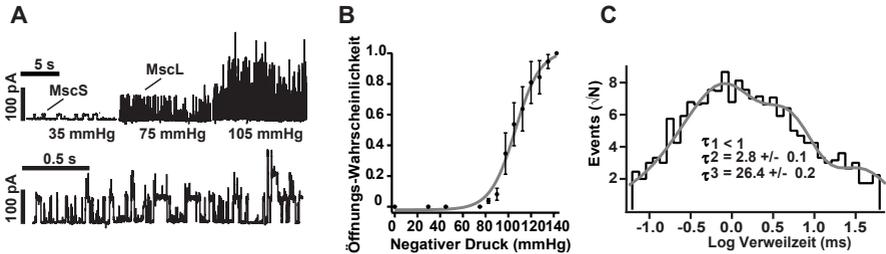


Abbildung 3.15: MscL in Sphäroplasten aus *E. coli*. A: Repräsentative Aufnahme von Einzelkanalaktivität bei unterschiedlichem Druck, im unteren Ausschnitt eine vergrößerte Darstellung B: Öffnungswahrscheinlichkeit als Funktion des applizierten Drucks, $P_{1/2}$ betrug $106,6 \pm 6 \text{ mmHg}$ C: Analyse der Verweilzeit im offenen Zustand.

Wie bei der Arbeit mit isoliertem Protein standen auch hier wieder Daten zum Vergleich zur Verfügung, die an einem konventionellen System von der Universität Groningen erhoben wurden. Hier wurde ein Verhältnis des Aktivierungsdruckes von $1,5 \pm 0,2$ berechnet. Die Leitfähigkeit von MscS betrug 1 nS , von MscL $3,5 \text{ nS}$. Bei einem Druck von $97,3 \pm 0,4 \text{ mmHg}$ war MscL zu 50% aktiv, und die Drucksensitivität lag bei $6,4 \pm 2,7 \text{ mmHg}$. Ebenso wurde die Kinetik analysiert und die Zeitkonstanten berechnet (Abb. 3.16).

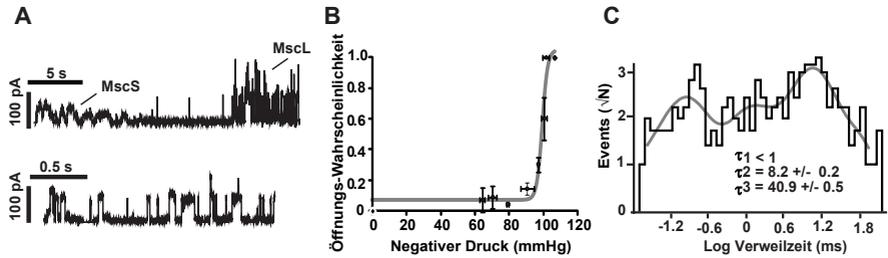


Abbildung 3.16: MscL Aktivität in Sphäroplasten, gemessen an einem konventionellen Patch Clamp System. A: Repräsentative Aufnahme von Einzelkanalaktivität bei unterschiedlichem Druck, im unteren Ausschnitt eine vergrößerte Darstellung des MscL Stroms B: Öffnungswahrscheinlichkeit als Funktion des applizierten Drucks, $P_{1/2}$ beträgt $97,3 \pm 0,4$ mmHg C: Analyse der Verweilzeit im offenen Zustand.

3.3 Charakterisierung von NCX_Mj

3.3.1 Etablierung der Methode

Um eine detaillierte elektrophysiologische Charakterisierung der prokaryotischen NCX Isoform NCX_Mj zu ermöglichen, wurde eine SSM basierte Methode etabliert. Dazu wurde zunächst ein Verfahren entwickelt, um isoliertes NCX_Mj Protein aus *E. coli* in unilamellare Lipidvesikel zu rekonstituieren. Diese wurden dann auf einer SSM (DPhPC auf Gold) immobilisiert. Dieser Sensor, also die Goldelektrode mit der SSM und den darauf adhärenen NCX-Liposomen, wurde in das Perfusionssystem des SURFE2R N1 Gerätes integriert, das den schnellen und automatisierten Austausch von verschiedenen extraliposomalen Puffern in einem kontinuierlichen Volumenstrom ermöglicht.

Zur Aktivierung des NCX_Mj Stroms $I_{Na/Ca}$ wurden zwei unterschiedli-

che Modi entwickelt. Zunächst wurde $I_{Na/Ca}$ als Auswärtsstrom mithilfe eines nach außen zeigenden Natriumgradienten aktiviert. Der Gradient wurde durch Beladung der Vesikel während der Sensorpräparation mit 140 *mM* Natrium erzeugt. Im weiteren Verlauf des Experiments waren die externen Puffer natriumfrei. Als Trigger zur synchronisierten Aktivierung von $I_{Na/Ca}$ wurde ein Puffer mit 100 μM freiem Calcium zugegeben. Die Anwesenheit von Calcium auf der externen Seite der Natrium-gefüllten Vesikel erzeugt ein transientes negatives Stromsignal, wie in Abbildung 3.17 dargestellt. Dieses entsteht aufgrund der negativen Netto-Ladung, die durch den elektrogeneren Transport von Calcium und Natrium in den Vesikeln aufgebaut wird. Da die Zusammensetzung des externen, calciumhaltigen Puffers gut variiert werden kann, eignet sich dieser Modus zur Studie der Calciumaffinität und -selektivität.

Um die Natriumaffinität und -selektivität zu untersuchen, musste der Assay invertiert werden, also Natrium als Trigger von $I_{Na/Ca}$ dienen (Abb. 3.18). Um dies zu erreichen, wurden die Sensoren mit einem calciumhaltigen (20 *mM*), natriumfreien Puffer beladen. Die Aktivierung von NCX erfolgte mit der Zugabe von 10 *mM* Natrium auf der externen Seite. Durch die Natriumzugabe wird eine relativ hohe Veränderung der Osmolarität und Ionenstärke verursacht. Um dies zu kompensieren, enthielt der Kontrollpuffer 10 *mM* Cholinchlorid zur Substitution. Weitere 50 *mM* Cholinchlorid, sowohl im Kontrollpuffer als auch im aktivierenden Puffer, halfen einen noch stabileren Basisstrom zu erzeugen. Da nun durch den Transportvorgang eine positive Nettoladung entsteht, zeigt der Signalstrom in positive Richtung.

Die Reproduzierbarkeit und Effizienz der Methode wurden statistisch analysiert. Die Variation der Stromamplitude zwischen verschiedenen Rekonstitutionsansätzen war gering: Bei Mittelung der maximalen $I_{Na/Ca}$ -Amplitude von 10 Rekonstitutionsansätzen calciumhaltiger Liposomen ergab sich ein Wert

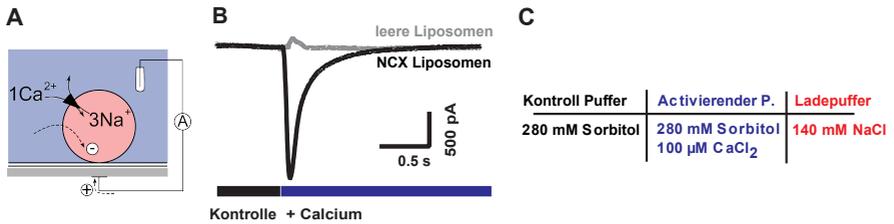


Abbildung 3.17: SSM basierter NCX_Mj Assay in Liposomen, Calcium dient als Aktivator. NCX_Mj wurde in Liposomen rekonstituiert, welche dann auf einer SSM immobilisiert werden. Die SSM mit den Liposomen auf einer Goldelektrode bilden einen Sensor, der in ein Perfusionssystem integriert wird. A: Schema des experimentellen Ablaufs: Die Liposomen wurden mit Natrium beladen, $I_{Na/Ca}$ wird durch Zugabe von externem Calcium getriggert. Calcium wird in die Liposomen transportiert, während Natrium die Liposomen verlässt. Aufgrund der Stöchiometrie des Austausches entsteht eine negative Nettoladung in den Liposomen. B: Typische Stromantwort. Eine negative Nettoladung in den Liposomen erzeugt einen negativen Signalstrom C: Bestandteile der Salzlösungen, die für die Aktivierung von $I_{Na/Ca}$ relevant sind.

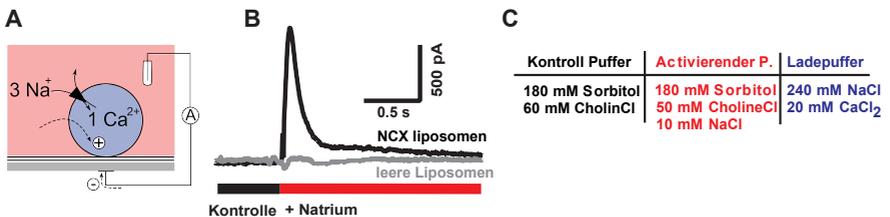


Abbildung 3.18: SSM basierter NCX_Mj Assay in Liposomen, Natrium dient als Aktivator. A: Das Schema des experimentellen Ablaufs. Die Liposomen sind mit Calcium beladen, $I_{Na/Ca}$ wird durch Zugabe von externem Natrium getriggert. B: Typische Stromantwort. Eine positive Nettoladung wird in die Liposomen transportiert und erzeugt so einen positiven Signalstrom C: Bestandteile der Salzlösungen, die für die Aktivierung relevant sind.

von $1116 \pm 125 \text{ pA}$, bei Mittelung von 12 Ansätzen natriumhaltiger Liposomen ein Wert von $-830 \pm 21 \text{ pA}$. Dabei wurde je Sensor eine Proteinmenge von ca. $1 \text{ }\mu\text{g}$ verwendet. Zum Vergleich wurden auch Kontrollmessungen an Liposomen ohne integriertes NCX_Mj Protein durchgeführt. Das mittlere Strommaximum lag für natriumhaltige Kontrollliposomen bei $83 \pm 21 \text{ pA}$, bei calciumhaltigen bei $72 \pm 6 \text{ pA}$. Hiermit wurde gezeigt, dass das mittlere Stromsignal deutlich über Störungen des Basisstroms (Rauschen, fluidisch oder chemisch bedingten Artefakten) liegt (Abb. 3.19 A).

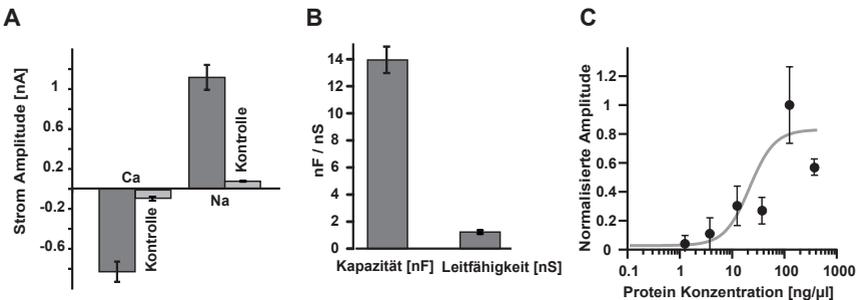


Abbildung 3.19: Effizienz und Reproduzierbarkeit der Methode. A: Mittlere Stromamplitude verschiedener Rekonstitutionsansätze. Das mittlere Calcium-induzierte Signal betrug $-830 \pm 21 \text{ pA}$ ($N=10$), das mittlere Natrium-induzierte Signal $1116 \pm 125 \text{ pA}$ ($N=12$). B: Sensor Qualität. Die mittlere Kapazität der Sensoren lag bei $13,9 \pm 1 \text{ nF}$, die mittlere Leitfähigkeit bei $1,2 \pm 0,12 \text{ nS}$. C: Untersuchung der Rekonstitutionseigenschaften. Bei steigender Proteinkonzentration während der Rekonstitutionsphase erhöht sich auch das gemessene Stromsignal, allerdings nur bis zu einem Maximum von $125 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

Die durchschnittliche Qualität der Sensoren war mit einer Kapazität von $13,9 \pm 1 \text{ nF}$ und $1,2 \pm 0,12 \text{ nS}$ sehr gut. Weniger als 10% der Sensoren wurden aufgrund schlechter Werte aussortiert. Diese wurden nicht in die Statistik aufgenommen (Abb. 3.19 B). Die Sensoren mit ihrem Aufbau aus SSM und proteinhaltigen Liposomen zeigten eine hohe Stabilität. Bei Lagerung der Sensoren über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ konnten auch am nächsten Tag gute Werte von Kapazität und Leitfähigkeit gemessen, und $I_{Na/Ca}$ erregt werden. Um den

Rekonstitutionsprozess zu optimieren, wurden verschiedene Lipid zu Protein Verhältnisse während der Rekonstitution verglichen. Die Detergenzkonzentration wurde auf einen einheitlichen Wert eingestellt. Mit steigender Menge an Protein erhöhte sich auch das registrierte Stromsignal, jedoch nur bis zu einem Wert von $125 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Danach fiel die durchschnittliche Stromamplitude wieder ab. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass zu viel integriertes Protein die Liposomen destabilisieren kann und so trotz höherer Proteinmenge weniger intakte Liposomen auf dem Sensor immobilisiert sind (Abb. 3.19 C).

3.3.2 Charakterisierung von NCX_Mj

Mithilfe der zwei etablierten Aktivierungsmodi – durch externes Calcium oder Natrium – war es möglich, die Affinität von NCX_Mj für seine Substrate Calcium und Natrium zu untersuchen. Zum Vergleich wurden die Experimente auch mit dem eukaryotischen NCX1, exprimiert in der Plasmamembran von HEK293, durchgeführt (Abb. 3.20). Membranfragmente der Zellen wurden isoliert und als Vesikel auf der SSM immobilisiert. Dazu wurde ein Protokoll von Geibel u. a. (2006) als Richtlinie für die Sensorpräparation verwendet. Der EC_{50} von Calcium lag bei $0,33 \pm 8 \mu\text{M}$ (N=5, SEM) für NCX_Mj und bei $0,42 \pm 20 \mu\text{M}$ (N=3, SEM) für NCX1. NCX_Mj zeigte 50% der maximalen Amplitude in Anwesenheit von $20,1 \pm 1,5 \text{ mM}$ (N=4, SEM) Natrium, NCX1 in Anwesenheit von $44,1 \pm 0,7 \text{ mM}$ (N=3, SEM).

Wurde $I_{Na/Ca}$ durch externes Natrium getriggert, konnte ein Anstieg des Amplitudenmaximums über die ersten Aktivierungszyklen beobachtet werden (Abb. 3.21). Bis zu dreimal erhöhte sich das Signal signifikant, wobei eine Gesamtsteigerung von über 50% erreicht werden konnte. Danach blieb die Signalamplitude stabil. Wird $I_{Na/Ca}$ durch externes Calcium ausgelöst,

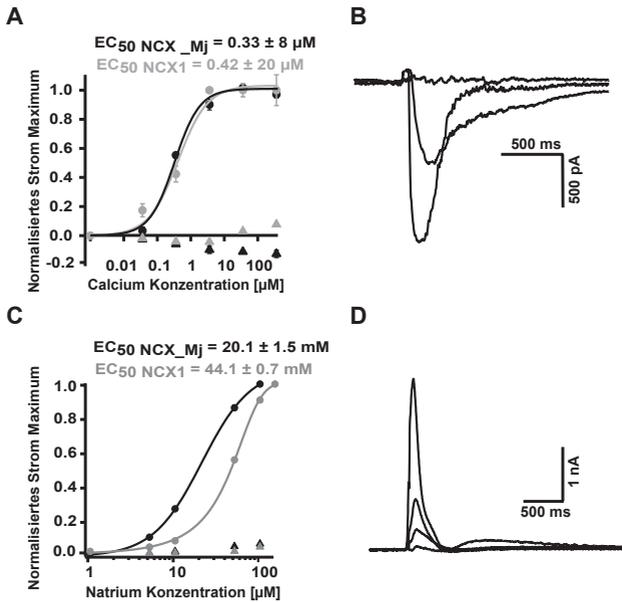


Abbildung 3.20: Calcium und Natrium Affinität von NCX_Mj im Vergleich mit NCX1. A: Die Calcium Affinität wurde bestimmt, indem Vesikel, beladen mit 140 *mM* Natrium, durch calciumhaltigen Puffer variierender Konzentration aktiviert wurden (N=5). Hill Koeffizient 1,1 für NCX_Mj und 1,06 für NCX1. B: Repräsentative NCX_Mj Stromantworten bei unterschiedlicher externer Calciumkonzentration. C: Natriumaffinität. Die Vesikel sind beladen mit 10 *mM* Calcium, die Aktivierung erfolgt durch variable Natriumkonzentrationen im Puffer. Da Natrium in hohen Konzentrationen benötigt wird, ist es im Kontrollpuffer durch Cholin substituiert worden (N=4), Hill=1,7 für NCX_Mj und 1,4 für NCX1. d: Repräsentative Stromantworten bei unterschiedlicher Natriumkonzentration. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler und sind teilweise von den Datenpunkten verdeckt. Die schwarzen abgebildeten Kurven zeigen NCX_Mj, die grauen NCX1. Dreieckige Datenpunkte repräsentieren Kontrollmessungen mit leeren Liposomen bzw. parentaler Zellmembran.

tritt dieser Effekt nicht auf.

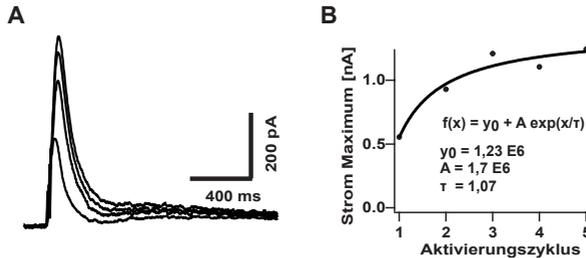


Abbildung 3.21: Anstieg der Amplitude von $I_{Na/Ca}$ während der ersten Aktivierungszyklen bei Natrium-getriggerten Signalen. A: Repräsentative Stromantworten. Während der ersten vier Aktivierungszyklen wächst das NCX_Mj Signal um über 50% an. B: Auftrag der Strommaxima gegen der Aktivierungszyklus. Der Verlauf folgt annähernd einer Exponentialfunktion.

Alle eukaryotischen NCX Isoformen können durch einige divalente Kationen, beispielsweise Cadmium und Mangan, inhibiert werden (Blaustein und Lederer, 1999; Iwamoto und Shigekawa, 1998). In dieser Arbeit wurde der Effekt von Cadmium, Mangan und Magnesium auf NCX_Mj untersucht. $I_{Na/Ca}$ wurde durch $100 \mu M$ Cadmium vollständig unterdrückt, unabhängig vom Aktivierungsmodus (Abb. 3.22 A). Der IC_{50} von Cadmium lag bei $2,22 \pm 0,3 \mu M$ (Abb. 3.22 B). Die Inhibition durch Cadmium ist teilweise reversibel (Abb. 3.22 C). Mangan und Magnesium zeigten nur eine sehr schwache inhibierende Wirkung. Bei hohen Konzentrationen im millimolaren Bereich kann Magnesium jedoch mit Calcium um die Bindungsstellen konkurrieren, was sich in einer niedrigeren Calcium Affinität in der Anwesenheit von Magnesium zeigte (Abb. 3.22 C).

Die Selektivität von NCX_Mj für seine Substrate Natrium und Calcium wurde untersucht, indem verschiedene monovalente Kationen als Ersatz für Natrium und divalente Kationen als Ersatz für Calcium getestet wurden. Es zeigte sich eine hohe Spezifität für Natrium, Calcium konnte dagegen erfolg-

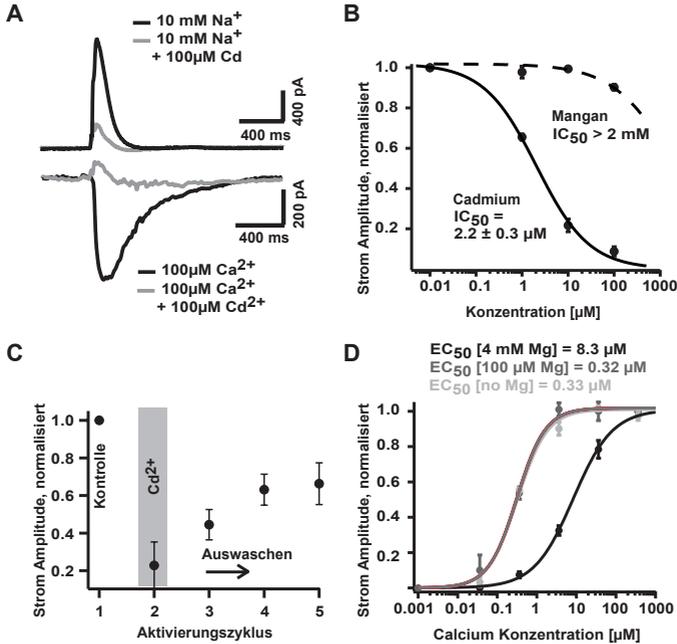


Abbildung 3.22: Inhibition von NCX_Mj durch divalente Kationen. A: Individuelle Strom Antworten von Natrium und Calcium-getriggertem $I_{Na/Ca}$. Beide werden durch 100 μM Cadmium vollständig inhibiert. B: Dosis-Wirkung-Kurven von Cadmium und Mangan. Cadmium erzeugt eine starke Inhibition bei niedrigen Konzentrationen ($IC_{50} = 2,2 \mu M$, $N=3$), Mangan verringert das Signal bei 100 μM dagegen nur auf 85% ($N=2$). C: Die Inhibition durch Cadmium ist teilweise reversibel. Die Stromamplitude erreicht nach Auswaschen des Inhibitors ungefähr 60% des Ursprungssignals. D: Wirkung von Magnesium. Magnesium inhibiert das Signal bei niedrigen Konzentrationen nicht. Bei höheren Konzentrationen (4 mM) jedoch verursacht es eine Verschiebung der Calcium Affinität hin zu höheren Konzentrationen. 100 μM Magnesium zeigt noch keine Wirkung. Hill = 0,9 (4 mM), 1,2 (100 μM), 1,2 (kein Mg²⁺).

3 Ergebnisse

reich substituiert werden. Magnesium, Strontium und Barium wurden als Ersatzsubstrate anstelle von Calcium getestet, Kalium, Rubidium und Lithium als Ersatz für Natrium. Die Liposomen wurden mit hohen Konzentrationen der zu untersuchenden Kationen (140 mM bei monovalenten und 20 mM bei divalenten Kationen) beladen und $I_{Na/Ca}$ wie zuvor durch die externe Zugabe von 100 μM Calcium bzw. 10 mM Natrium aktiviert. Alle Sensoren, die mit divalenten Kationen beladen waren, zeigten Aktivität (Abb. 3.23 A). Strontium-beladene Sensoren erzeugten sogar höhere Stromamplituden als solche mit Calcium (145 \pm 15 %). Magnesium und Barium beladene Liposomen erreichten etwas kleinere Signale (63 \pm 3 % und 78 \pm 3 %). Bei den monovalenten Kationen zeigten nur Liposomen mit Lithium sehr kleine Signale (23 \pm 5 %), Rubidium und Kalium konnten keine Aktivität erzeugen (Abb. 3.23 B).

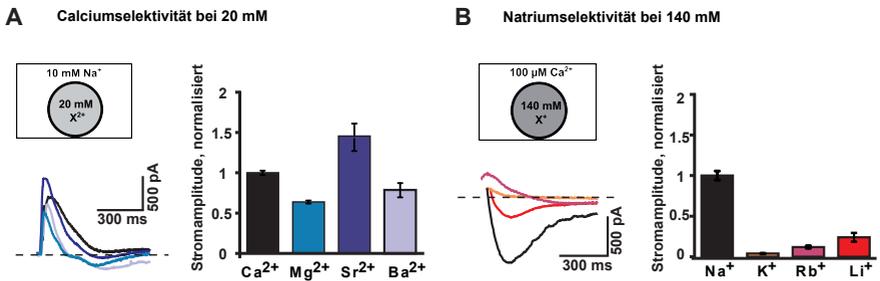


Abbildung 3.23: Selektivität von NCX_Mj bei hoher Substratkonzentration. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, $N \geq 3$ für jedes Experiment. A: Calcium Selektivität bei 20 mM. Die Liposomen auf den Sensoren sind mit unterschiedlichen divalenten Kationen (Ca, Mg, Sr, Ba) beladen (20 mM), die Aktivierung erfolgt mit 10 mM Natrium. Alle Sensoren zeigen NCX Aktivität. B: Natrium Selektivität bei 140 mM. Die Liposomen sind mit 140 mM der unterschiedlichen monovalenten Kationen (Na/K/Rb/Li) beladen, die Aktivierung erfolgt durch 100 μM Calcium. Lithium beladene Liposomen zeigen eine geringe Aktivität. Sensoren mit Rubidium generieren kleine positive Signale, ein ähnlicher Effekt wie zuvor bei Magnesium, die jedoch nicht als NCX Signale bewertet werden.

Aufgrund dieser positiven Resultate wurde auch untersucht, ob die jeweiligen Kationen in einem physiologischen Konzentrationsbereich eine ähnliche Wirkung generieren können. Dazu wurden die Liposomen wieder mit 20 mM Calcium oder 140 mM Natrium beladen und die Aktivierung mit den zu untersuchenden Kationen durchgeführt. Dazu wurden 100 μM der jeweiligen divalenten Kationen und 10 mM der monovalenten Kationen auf der externen Seite zugegeben. Hier zeigte von den divalenten Kationen nur noch Strontium einen Effekt. Das Strontium Signal erreicht jedoch wieder deutlich größere Amplituden ($168 \pm 51 \%$) als Calcium selbst (Abb. 3.24 A). Kein untersuchtes monovalentes Kation war in der Lage, Natrium in dieser Konzentration zu ersetzen (Abb. 3.24 B). Lithium erzeugte kleine NCX-artige Signale, welche jedoch insensitive auf Cadmium waren. Es handelt sich daher vermutlich um rein physikalische Artefakte.

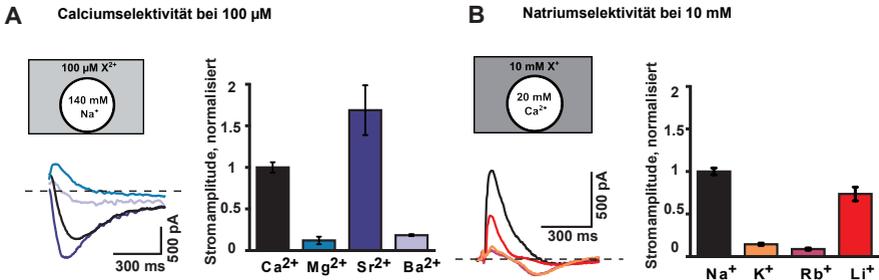


Abbildung 3.24: Selektivität von NCX_Mj bei niedriger Substratkonzentration. A: Calcium Selektivität bei 100 μM . Natriumbeladenen Sensoren werden durch 100 μM des jeweiligen divalenten Kations aktiviert. Strontium erzeugt NCX Ströme mit einer höheren Amplitude als Calcium. Magnesium generiert einen kleinen positiven Peak vor dem Zeitpunkt an dem ein mögliches Signal entstehen könnte. Dies ist kein NCX Signal, sondern ein physikalischer Effekt des Magnesium Konzentrations-sprungs. B: Natrium Selektivität bei 10 mM. Calcium geladene Sensoren wurden vorbereitet und mit 10 mM der jeweiligen monovalenten Kationen aktiviert. Kleine Lithium Signale können identifiziert werden. Diese sind jedoch nicht sensitiv auf Cadmium, vermutlich handelt es sich wenigstens zum Teil um einen physikalischen Effekt.

Aufgrund der hohen Signale, die durch Strontium entstehen können, wurde die Strontiumaffinität genauer untersucht (Abb. 3.25). Ein EC_{50} von $19,5 \pm 4 \mu M$ wurde bestimmt. Obwohl Strontium höhere Signale als Calcium erzeugt, ist die Sensitivität dennoch etwas niedriger als die für Calcium (vergl. 0,33 μM).

Zuvor wurde auch beobachtet, dass Magnesium in hoher Konzentration die Calciumsensitivität beeinflusst (Abb. 3.22) und als Substrat für NCX dient (Abb. 3.23). Es wurde daher zusätzlich untersucht, ob der Austausch von Magnesium gegen Natrium mit einer anderen Natriumaffinität geschieht als der Austausch von Calcium gegen Natrium (Abb. 3.25C). Dazu wurden Liposomen mit 20 mM Magnesium beladen. Unter diesen Bedingungen betrug die Natriumaffinität $31,7 \pm 3 mM$ (vergl. $20,1 \pm 1,5 mM$ mit Calcium).

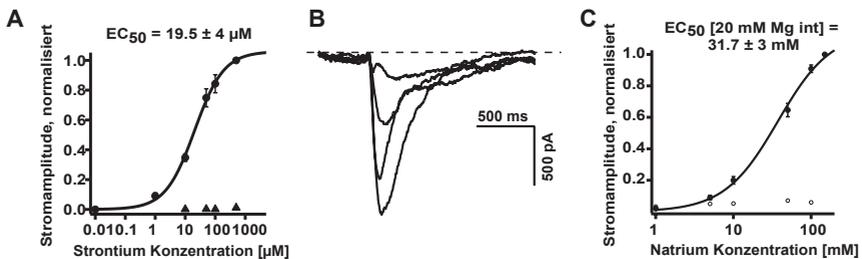


Abbildung 3.25: Alternative Substrate. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler, die EC_{50} wurden mit einer Hill-Funktion für jedes einzelne Experiment berechnet und aus den Ergebnissen der hier angegebene Mittelwert berechnet. A: Konzentrationsabhängigkeit der Strontium Aktivität. Die Liposomen sind mit 140 mM Natrium beladen, die Puffer enthalten kein EGTA (N=3). Hill = 0,9. B: Repräsentative Stromantworten eines individuellen Natrium-geladenen Sensors auf steigende Strontiumkonzentrationen C: Konzentrationsabhängigkeit von Natrium, wenn statt gegen Calcium gegen Magnesium ausgetauscht wird. Die Liposomen sind mit 20 mM Magnesium beladen. Hill = 1,3. Die nicht ausgefüllten Datenpunkte sind entsprechende Kontrollmessungen, durchgeführt an Liposomen ohne NCX.

4 Diskussion

Das Spektrum der Möglichkeiten zur elektrophysiologischen Untersuchung von Ionentransportsystemem von prokaryotischen Plasmamembranen und der damit verwandten IMM ist bislang unzureichend. Durch die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden werden Techniken bereitgestellt, die die Identifizierung und Charakterisierung dieser Transporter in ihrer Effizienz, Erfolgsquote und Reproduzierbarkeit verbessern. Diese Methoden konnten auf aktuelle Problemstellungen angewendet werden und zeigen damit ihre Funktionalität und Relevanz. Zum einen gelang die Entwicklung einer Patch Clamp basierten Methode mit deren Hilfe die molekulare Identität des Kaliumkanals mitoBK_{Ca} bestätigt werden konnte. Andererseits wurden zwei komplementäre Methoden für die effizientere Arbeit mit bakteriellen, insbesondere mechanosensitiven Ionenkanälen entwickelt. Schließlich wurde eine SSM-basierte Technik erarbeitet, die die bisher noch nicht gelungene elektrophysiologische Charakterisierung des prokaryotischen Transporters NCX_Mj ermöglichte. Diese drei Themenfelder sollen nachfolgend einzeln diskutiert werden.

4.1 MitoBK_{Ca} in Mitoplasten

Die Hypothese, dass das Gen KCNMA1 die molekulare Grundlage des mitochondrialen Kaliumkanals mitoBK_{Ca} bildet, ist nicht gesichert. Es gibt außerdem kaum zuverlässige Daten zur Funktion des Kanals. In dieser Arbeit wurden die Existenz des Kanals in nativen kardialen Mitochondrien bestätigt und auf das Gen KCNMA1 zurückgeführt sowie Charakteristika des Kanals analysiert.

Dies gelang mithilfe einer speziell optimierten Methode, die eine effiziente elektrophysiologische Untersuchung der IMM nativer Kardiomyozyten ermöglicht. Dazu wurden Mitoplasten in einem besonders schonendem Verfahren aus Herzgewebe isoliert und mithilfe eines planaren Patch Clamp Systems untersucht. Ausschlaggebend für die Präparation intakter und stabiler Mitoplasten (Kap. 2.1) zeigte sich besonders die Isolation vitaler Kardiomyozyten in einem ersten Teilschritt. Die Verwendung isolierter Zellen anstatt eines Gewebehomogenisats erlaubte die Reduktion der notwendigen Zentrifugationsschritte und der damit einhergehenden mechanischen Belastung. Die Verwendung eines planaren Patch Clamp Systems erwies sich als vorteilhaft, insbesondere da die Positionierung der Mitoplasten nicht manuell erfolgt. Dies erübrigte die Immobilisierung der Mitoplasten und erlaubte eine Teilautomatisierung des Prozesses (Kap. 2.8.1).

Beim planaren Patch Clamp Verfahren ist standardmäßig keine Möglichkeit zur optischen Beobachtung vorgesehen. Durch die zufällige Auswahl eines Mitoplasten findet daher keine systematische Selektion nach bestimmten Eigenschaften, beispielsweise der Größe, statt. Es wird somit eine repräsentative Stichprobe aus der Grundgesamtheit gewählt. Andererseits muss die Identität des Objekts mit besonderer Sorgfalt verifiziert werden, da möglicherweise Verunreinigungen aus der Präparation (Zelltrümmer, zerstörte Mitoplasten, intakte Mitochondrien) anstelle von Mitoplasten auf die Apertur des Chips gesaugt werden könnten. Diese Verifikation ist bei jedem untersuchten Mitoplasten obligatorisch, auch weil ausgeschlossen werden muss, dass die Mitoplasten mit der „Cap“ aus OMM auf dem Chip positioniert werden. Die Identität der Mitoplasten konnte durch die zu beobachtende charakteristische Mischung aus makroskopischen Strömen und Einzelkanalaktivitäten (Fieni u. a., 2012) sowie das reproduzierbare Auftreten von IMAC, einem gut beschriebenen Anionenkanal der IMM (Powers und Beavis, 1991; Borecky u. a., 1997), bestätigt werden. Die qualitative Untersuchung von OMM in

Bilayern bekräftigte dies weiter, denn hier zeigten sich mit dem Auftreten großer Poren und des gut beschriebenen Kanals VDAC (Blachly-Dyson und Forte, 2001) deutlich andere Charakteristika. Die auftretenden endogenen Ionenströme zeigten sich also zur Identifizierung des jeweiligen Objekts auf dem planaren Patch Clamp Chip geeignet.

Die Patch Clamp Konfiguration der Mitoplasten auf dem planaren Chip war zunächst unklar, weil der für Zellen typische sprunghafte Anstieg der Kapazität bei Erreichen des „whole cell“ Modus nicht beobachtet wurde. Aus mehreren Hinweisen kann aber gefolgert werden, dass in geöffneten Mitoplasten, also „whole cell“, gemessen wurde. Das Auftreten makroskopischer Ionenströme, die Abhängigkeit des endogenen Chloridstroms vom Chloridgehalt der externen Lösung und die Kapazität im Bereich von 1 pF sind deutliche Indizien. Vergleichbare Werte für die Kapazität von Mitoplasten im „whole cell“ Modus wurden von Kirichok u. a. (2004) (0.67 pF) und Fieni u. a. (2012) berichtet. Aufgrund der Streukapazität des verwendeten Systems von ca. 7 pF unterliegt dieser Wert einer hohen Ungenauigkeit, befindet sich aber noch im auflösbaren Bereich. Die Kapazität von 1 pF steht für ein Objekt mit einem Durchmesser von ca. 5-6 μm , wenn eine Membrankapazität von 1 $\mu F/cm^2$ und ein kugelförmiges Objekt vorausgesetzt werden. Dies entspricht der optisch bestimmten Größe der Mitoplasten. Es werden also Ströme aus der gesamten Membran abgeleitet, wobei die interne Seite des Patch Clamp Chips der mitochondrialen Matrix entspricht.

Die entwickelte Methode zeigte sich für die Untersuchung des Kaliumkanals mitoBK_{Ca} in kardialen Mitoplasten geeignet. Die nativen Mitoplasten zeigten vier unterschiedlich große Kaliumleitfähigkeiten. Theoretisch könnte es sich bei den zwei kleineren Leitfähigkeiten (60 pS , 150 pS) um Hinweise auf die in Mitochondrien beschriebenen Kaliumkanäle K_{ATP} und K_v1.3 handeln. Gelegentlich auftretende Öffnungen mit sehr großer Leitfähigkeit von

ca. 400 pS können Teilöffnungen von mPTP entsprechen. Die vierte auftretende Leitfähigkeit, 190 pS , entspricht der erwarteten Charakteristik von $K_{Ca1.1}/\text{mitoBK}_{Ca}$.

Alle beobachteten Kaliumleitfähigkeiten waren nicht kontinuierlich aktiv, sondern zeigten lange inaktive Phasen. Für den Vergleich von nativen und $BK-/-$ Mitoplasten mussten die Kanalaktivitäten daher über einen längeren Zeitraum beobachtet und die Häufigkeit des Auftretens der jeweiligen Leitfähigkeiten statistisch analysiert werden. Auf diese Weise gelang der Nachweis, dass die beobachtete Leitfähigkeit 190 pS dem putativen mitoBK_{Ca} entspricht. Während 190 pS in $BK-/-$ gar nicht auftrat, erhöhte sich die Häufigkeit von 60 pS signifikant. Dies könnte die verstärkte Expression eines alternativen Kaliumkanals als Ersatz für mitoBK_{Ca} widerspiegeln. Vergleichende Proteinexpressionsanalysen von bekannten Kaliumkanälen in $BK+/+$ und $BK-/-$ könnten dazu weitere Informationen liefern.

Die wenigen Arbeiten zur Elektrophysiologie von mitoBK_{Ca} (Xu u. a., 2002; Siemen u. a., 1999) nutzen als Kontrolle Charybdotoxin, einen bekannten Blocker von BK-Kanälen. In dieser Arbeit konnte durch den Vergleich mit einem KCNMA1 defizienten Mausmodell erstmals mit einem sehr belastbaren Kontrollsystem gearbeitet werden. Damit gelang es, die Existenz von mitoBK_{Ca} in den Mitochondrien des Herzens auf sehr direkte Weise zu bestätigen und seine Identität auf das ausgeschaltete Gen KCNMA1 zurückzuführen. Dies unterstützt die Hypothese von Singh u. a. (2013), dass mitoBK_{Ca} eine spezielle Splicing-Variante des Gens sei. Wie die Arbeit von Singh u. a. (2013) basieren die meisten wichtigen Arbeiten zur Identität von mitoBK_{Ca} auf molekularbiologischen Methoden. Rein molekularbiologische Analysen der mitochondrialen Ionenkanäle haben jedoch den Nachteil, dass Verunreinigungen aus der Plasmamembran oder anderen Organellen nur schwierig ausgeschlossen werden können.

Die Analyse der Charakteristik von mitoBK_{Ca} lieferte Daten zu Leitfähigkeit, Kinetik und Pharmakologie des Kanals. Die Wirksamkeit des bekannten BK-Aktivators NS11021 sowie des Inhibitors Paxillin konnte nachgewiesen werden. Dies ist von besonderer Relevanz, da auf der Wirkung dieser und verwandter Verbindungen (z.B. NS1619, Iberiotoxin, Charybdotoxin) viele physiologische Studien zum Einfluss von mitoBK_{Ca} auf die ischämische Präkonditionierung basieren. Die Wirksamkeit auf mitoBK_{Ca} wurde dabei vorausgesetzt. Sie konnte hier in einem direkten Verfahren nachgewiesen werden.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit konnten für weitere Projekte genutzt werden (Soltysinska u. a., 2014). Es wurde gezeigt, dass BK^{-/-} Mitochondrien eine generell verringerte OXPHOS Kapazität und eine erhöhte ROS Produktion nach IR Ereignissen haben. In ex-vivo Versuchen stellte sich heraus, dass die Infarktgröße in BK^{-/-} Herzen ohne Präkonditionierung identisch mit der in wild-typ Herzen war. Jedoch war die durch Präkonditionierung erreichte Verkleinerung des Infarktbereichs in BK^{-/-} Herzen schwächer, ein Hinweis, dass mitoBK_{Ca} tatsächlich eine Rolle beim IP-vermittelten Zellschutz spielt.

4.2 MscL in Bilayern und Sphäroplasten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Techniken entwickelt und validiert, die die elektrophysiologische Arbeit mit bakteriellen, mechanosensitiven Ionenkanälen erleichtern. Als Modellsystem wurde MscL verwendet.

Aus lösungsmittelfreien GUVs mittels „Spreading“ hergestellte Bilayer wurden genutzt um den rekonstituierten mechanosensitiven Ionenkanal MscL zu untersuchen. Die mechanische Stabilität der erzeugten Bilayer und die Abwe-

senheit von Lösungsmitteln erlaubten die Applikation von bis zu 200 mBar Unterdruck, was für die Aktivierung von MscL ausreichend ist. Damit gelang es erstmals einen mechanosensitiven Kanal in planaren Bilayern zu untersuchen.

Um mechanosensitive bakterielle Ionenkanäle alternativ in einem nativen System zu studieren, wurden Sphäroplasten verwendet. Die Präparation von Sphäroplasten gelang durch die Adaption eines bekannten Protokolls (Blount und Moe, 1999), wobei sich eine starke Abhängigkeit der Effizienz von Alter, Dichte und Wachstumsphase der Kultur, Bakterienstamm und Proteinexpression zeigt. Durch die Verwendung eines planaren Patch Clamp Systems zur Untersuchung der Sphäroplasten ergaben sich zwei Hauptvorteile: Mit Hilfe eines automatisierten Protokolls zur Steuerung von Ansaugdruck und Membranspannung (Kap. 2.8.2) kann schnell und effizient ein hoher Sealwiderstand etabliert werden. Außerdem kann zur Kanalaktivierung ein mit strikten Toleranzwerten exakt geregeltes Druckprotokoll appliziert werden.

Die mit Sphäroplasten und Bilayern erhobenen Daten zeigen erstmals, dass es möglich ist, mechanosensitive Ionenkanäle mit einem planaren Patch Clamp System zu studieren. In beiden Fällen zeigte MscL mit schneller Kinetik, hoher Leitfähigkeit und Aktivität ab ca. 90 mBar sein charakteristisches Verhalten. Der Basisstrom war stabil und frei von spontaner Kanalaktivität, was zeigt, dass die Membran keinen störenden Krafteinwirkungen ausgesetzt war und ein genau kontrollierter Druck ausgeübt wurde. Der Aufbau eines Patch Clamp Chips unterscheidet sich jedoch wesentlich von einer Patch Pipette. Dies legt nahe, dass auch die Krafteinwirkung auf ein Bilayer oder einen Sphäroplasten anders ist. MscL zeigte hier aber sowohl in Bilayern als auch in Sphäroplasten grundsätzlich Eigenschaften, die publizierten Werten konventioneller Messungen gut entsprechen (Hase u. a., 1995; Cruickshank u. a., 1997). Aufgrund der hohen Sensibilität für kleine Unterschiede in der

Methodik variieren die publizierten Werte jedoch deutlich. Daher bietet der Vergleich von Sphäroplasten und Bilayern untereinander, sowie der direkte Vergleich mit einem konventionellen System bessere Referenzwerte.

Bei diesem Vergleich zeigte sich ein Unterschied des notwendigen Aktivierungsdrucks zwischen Bilayern und Sphäroplasten bei Verwendung des planaren Systems. $P_{1/2}$ liegt im Bilayer bei 103 mBar, in Sphäroplasten bei 141 mBar. Für diese Differenz gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Zunächst besteht ein kleiner Unterschied in der Geometrie: Für Sphäroplasten müssen aufgrund ihrer geringen Größe Patch Clamp Chips mit einer Apertur von unter einem Mikrometer verwendet werden, Bilayer jedoch bilden sich am besten auf Aperturen von ca. einem Mikrometer. Die Kraft, welche auf die Membran wirkt, wächst bei konstantem Druck quadratisch mit dem Radius. Daraus resultiert auch eine lokal höhere Membranspannung. Bei einer größeren Apertur sollten also auch mechanosensitive Kanäle schon bei geringerem Druck aktiv werden, genau wie es hier beobachtet wurde. Eine alternative Erklärung ergibt sich durch den Unterschied der jeweiligen Membraneigenschaften. Durch eingelagerte Proteine und eine andere Lipidzusammensetzung könnte die native bakterielle Membran weniger flexibel sein als die künstliche Lipidmembran und dadurch erst bei höherem Druck eine Membranspannung im aktivierenden Bereich erreichen. Jedoch ist die Drucksensitivität in beiden Systemen mit 4,78 und 4,8 nahezu identisch, was gegen diese Theorie spricht. Dennoch zeigt sich hier der Vorteil eines nativeren Systems, das die direkte Untersuchung in der physiologischen Umgebung erlaubt. Für die Hypothese der unterschiedlichen Membrandurchmesser sprechen auch die Ergebnisse von Liposomen am konventionellen System. Hier wurden sowohl Sphäroplasten als auch Liposomen mit Pipetten mit einem Durchmesser von unter einem Mikrometer untersucht. $P_{1/2}$ liegt hier in beiden Fällen in einem ähnlichen Bereich wie bei Sphäroplasten am planaren System. Bei der Verwendung von Sphäroplasten war die beobachtete Charakteristik an planarem

und konventionellem System sehr ähnlich. Dies galt ebenso für die Versuche in Bilayern, abgesehen vom oben diskutierten Aktivierungsdruck. Die gemessenen und berechneten Werte an planarem und konventionellem Patch Clamp System sind also bei ähnlichen Randbedingungen vergleichbar.

Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erlaubt grundsätzlich die Verwendung eines planaren Systems und die Nutzung der daraus resultierenden Vorteile: Neben der Teilautomatisierung des Patchvorgangs hilft vor allem das regelbare Pumpensystem, die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Ergebnisse zu erhöhen. Da der Durchmesser der Pipettenspitze bzw. des Chips einen sehr starken Einfluss hat, helfen die mit geringer Toleranz maschinell gefertigten Patch Clamp Chips die Reproduzierbarkeit weiter zu verbessern. Bei Verwendung von Bilayern kann die Pufferzusammensetzung auf dem planaren System frei gewählt werden, die Anwesenheit von unphysiologisch hohen Konzentrationen divalenter Kationen ist nicht notwendig. In diesem Fall wurden auch deutlich höhere Sealwiderstände auf dem planaren System erreicht.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit zeigen weitere potentielle Anwendungsbereiche der planaren Patch Clamp Technik auf: Die einfachere und effizientere Arbeit mit Sphäroplasten macht diese Technik interessanter für die Identifikation und Charakterisierung unbekannter bakterieller Ionenkanäle. Zudem wurde gezeigt, dass mit einem planaren Chip anstelle einer Pipette grundsätzlich ähnliche mechanosensitive Eigenschaften zu beobachten sind. Damit könnte die planare Konfiguration auch für die Studie eukaryotischer mechanosensitiver Kanäle interessant sein.

4.3 NCX in festkörpergestützten Membranen

In dieser Arbeit wurde die funktionelle Ähnlichkeit des prokaryotischen Ionentransportes NCX aus *Methanococcus jannaschii* mit dem eukaryotischen NCX1 zum ersten Mal belegt. Dazu wurde eine SSM-basierte Methodik entwickelt, welche die detaillierte funktionelle Untersuchung dieser Isoform des Ionentransporters ermöglichte. Diese NCX Isoform wurde erfolgreich kristallisiert (Liao u. a., 2012) und dient daher als Strukturmodell für eukaryotische Isoformen.

Die etablierte Methode zeigte sich sehr flexibel was die Assaykonditionen (Puffer, Substrate) und das Ausgangsmaterial (eukaryotische Membranfragmente, bakterielles rekonstituiertes Protein) betrifft. Diese Möglichkeit zur Variation unterscheidet die Methode deutlich von den oft verwendeten Fluss-Assays. Sie erlaubt die detaillierte Charakterisierung elektrophysiologischer Eigenschaften und hat damit ähnliche Qualitäten wie die Patch Clamp Technik, bei gleichzeitig höherer Sensitivität und Flexibilität was das Ausgangsmaterial betrifft.

Die Charakterisierung der elektrophysiologischen Eigenschaften von NCX_Mj gab Einblicke in dessen Funktionalität und offenbarte eine hohe Ähnlichkeit zur eukaryotischen Isoform NCX1. Die beobachtete Stromcharakteristik bestätigt den elektrogenen Transportmodus und unterstützt so die postulierte Stöchiometrie von 3 Natrium gegen 1 Calcium. Die Affinitäten für Natrium und Calcium sind im erwarteten Bereich für ein Mitglied der NCX Familie angesiedelt (Blaustein und Lederer, 1999). Weiterhin zeigte die Untersuchung der Inhibition durch divalente Ionen, dass Cadmium mit IC_{50} von 2.2 μM ein potenter Inhibitor von NCX_Mj ist. Dieser Wert ist sogar noch etwas niedriger als beschriebene Werte für eukaryotische NCX Isoformen, die

sich zwischen 32 und 64 μM bewegen. Diese Werte wurden durch Calcium Fluss-Assays bestimmt (Iwamoto und Shigekawa, 1998). Zusätzlich wurde eine schwache Wirkung von Mangan und Magnesium beobachtet, was ähnlich auch bei eukaryotischen NCXs beschrieben wurde (Blaustein und Lederer, 1999; Iwamoto und Shigekawa, 1998). Außerdem wurde die Selektivität von NCX_Mj für die Substrate Natrium und Calcium untersucht. NCX_Mj zeigt eine hohe Selektivität für Natrium, Calcium kann jedoch sehr effektiv durch Strontium ersetzt werden. Obwohl die Affinität für Strontium geringer ist als für Calcium, sind die Stromamplituden deutlich höher. Auch Magnesium und Barium können Calcium ersetzen, jedoch nur in deutlich höheren Konzentrationen.

Die Affinität von NCX_Mj für Calcium und Natrium wurde direkt mit der humanen Isoform NCX1 verglichen. Mit 0,33 μM und 0,42 μM für Calcium und 20 mM bzw. 44 mM für Natrium, liegen diese Werte sehr nah beisammen. Gemeinsam mit der hier beobachteten typischen NCX Charakteristik zeigt dies eine hohe funktionelle Ähnlichkeit der prokaryotischen Isoform mit gut beschriebenen eukaryotischen NCX Isoformen. Dies ist ein wichtiges Argument für die Allgemeingültigkeit der anhand von NCX_Mj gewonnenen Erkenntnisse über den strukturellen Mechanismus der Natrium-Calcium Austauscher (Liao u. a., 2012). Die hohe funktionelle Kongruenz, insbesondere in Bezug auf die Calciumsensitivität, ist nicht unbedingt zu erwarten, da der prokaryotischen NCX Isoform eine große intrazelluläre regulatorische Domäne fehlt, die eukaryotische Formen besitzen (Philipson und Nicoll, 2000). Dies wirft eine neue Frage zur Funktion der regulatorischen Domäne auf, die in Relation zur Calciumsensitivität gesetzt wird. Die vergleichende funktionelle Analyse gezielter mutierter NCX Proteine mit der entwickelten SSM-basierten Methode bietet ein geeignetes Werkzeug, um diese und ähnliche Fragestellungen zur Struktur-Funktions-Beziehung in Zukunft weiter zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurden neue Möglichkeiten zur direkten Aktivitätsmessung von drei Ionentransportsystemen, die alle für verbreitete Methoden unzugänglich sind, geschaffen. Die entwickelten Methoden können in Zukunft weiterhin von Nutzen sein, um andere Ionentransportsysteme aus mitochondrialer und prokaryotischer Membran zu untersuchen. Sie bieten aber auch eine neue Basis für Weiterentwicklung und Adaption. Der große Wert neuer, geeigneter Werkzeuge zeigt sich unmittelbar und verdeutlicht, wie bedeutend die technologische Entwicklung für den wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn ist.

5 Zusammenfassung

Die Ionen-transportsysteme aus den mitochondrialen und prokaryotischen Membranen gewinnen zunehmend das Interesse der Grundlagen- und Pharmaforschung. Die funktionelle Untersuchung dieser Ionen-transportsysteme stellt jedoch besondere Anforderungen, die verbreitete Methoden oft nicht erfüllen können. Um die nötige technologische Entwicklung in diesem Feld voranzutreiben, wurden in dieser Arbeit für drei unterschiedliche mitochondriale oder prokaryotische Ionen-transportsysteme geeignete, neue Methoden etabliert.

Für die Untersuchung der inneren mitochondrialen Membran nativer Kardiomyozyten gelang die Entwicklung einer Patch Clamp basierten Methode, mit deren Hilfe der Kaliumkanal $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ identifiziert und charakterisiert werden konnte. Indem Mitochondrien von KCNMA1 knock-out und wild-typ Mäusen verglichen wurden, konnte gezeigt werden, dass KCNMA1 nicht nur $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ in der Plasmamembran, sondern auch $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ kodiert. Der mitochondriale Kanal ist von besonderem Interesse, weil ihm eine Rolle bei der ischämischen Präkonditionierung zugeschrieben wird. Zur Verbesserung der Effizienz und Reproduzierbarkeit bei der Arbeit mit bakteriellen, mechanosensitiven Kanälen wurden zwei komplementäre Methoden entwickelt. Die Patch Clamp Technik mit nativen Sphäroplasten konnte verbessert werden und es gelang erstmals die kontrollierte mechanische Aktivierung eines Ionenkanals in einem planaren Bilayer. Schließlich wurde eine auf festkörpergestützten Membranen basierende Technik erarbeitet, die die bisher nicht gelungene elektrophysiologische Charakterisierung des prokaryotischen Transporters NCX_Mj ermöglichte. Von dieser NCX Isoform liegt eine Kristallstruktur vor, sie dient daher als Modell für eukaryotische Isoformen. Hier konnte die funktionelle Ähnlichkeit des prokaryotischen Ionen-transportes mit dem euka-

ryotischen NCX1 zum ersten Mal belegt werden.

Die entwickelten Methoden konnten erfolgreich auf ungeklärte Fragestellungen angewendet werden und zeigen damit ihre Funktionalität und Relevanz. Sie können auch zukünftig von Nutzen sein, um weitere Ionentransportsysteme aus mitochondrialer und prokaryotischer Membran zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- [Alberts u. a. 2011] ALBERTS, B. ; JOHNSON, A. ; LEWIS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K. ; WALTER, P. ; HÄCKER, B.: *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH-Verlag, 2011. – URL <https://books.google.de/books?id=kJ8tBAAAQBAJ>. – ISBN 9783527323845
- [Alexander u. a. 2013a] ALEXANDER, S. P. ; BENSON, H. E. ; FACCENDA, E. ; PAWSON, A. J. ; SHARMAN, J. L. ; CATTERALL, W. A. ; SPEDDING, M. ; PETERS, J. A. ; HARMAR, A. J.: The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: ion channels. In: *Br. J. Pharmacol.* 170 (2013), Dec, Nr. 8, S. 1607–1651
- [Alexander u. a. 2013b] ALEXANDER, S. P. ; BENSON, H. E. ; FACCENDA, E. ; PAWSON, A. J. ; SHARMAN, J. L. ; SPEDDING, M. ; PETERS, J. A. ; HARMAR, A. J.: The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: ligand-gated ion channels. In: *Br. J. Pharmacol.* 170 (2013), Dec, Nr. 8, S. 1582–1606
- [Alexander u. a. 2013c] ALEXANDER, S. P. ; BENSON, H. E. ; FACCENDA, E. ; PAWSON, A. J. ; SHARMAN, J. L. ; SPEDDING, M. ; PETERS, J. A. ; HARMAR, A. J.: The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: transporters. In: *Br. J. Pharmacol.* 170 (2013), Dec, Nr. 8, S. 1706–1796
- [Bai u. a. 2011] BAI, Y. ; LI, M. ; HWANG, T. C.: Structural basis for the channel function of a degraded ABC transporter, CFTR. In: *J. Gen. Physiol.* 138 (2011), Nov, Nr. 5, S. 495–507

- [Bamberg u. a. 1993] BAMBERG, E. ; BUTT, H. J. ; EISENRAUCH, A. ; FENDLER, K.: Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes. In: *Q. Rev. Biophys.* 26 (1993), Feb, Nr. 1, S. 1–25
- [Beavis 1992] BEAVIS, AD: Properties of the inner membrane anion channel in intact mitochondria. In: *J Bioenerg Biomembr* 24:77-90 (1992)
- [Benard und Karbowski 2009] BENARD, G. ; KARBOWSKI, M.: Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability. In: *Semin. Cell Dev. Biol.* 20 (2009), May, Nr. 3, S. 365–374
- [Bentzen u. a. 2007] BENTZEN, B. H. ; NARDI, A. ; CALLOE, K. ; MADSEN, L. S. ; OLESEN, S. P. ; GRUNNET, M.: The small molecule NS11021 is a potent and specific activator of Ca²⁺-activated big-conductance K⁺ channels. In: *Mol. Pharmacol.* 72 (2007), Oct, Nr. 4, S. 1033–1044
- [Bers und Weber 2002] BERS, D. M. ; WEBER, C. R.: Na/Ca exchange function in intact ventricular myocytes. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 976 (2002), Nov, S. 500–512
- [Biel und Michalakis 2007] BIEL, M. ; MICHALAKIS, S.: Function and dysfunction of CNG channels: insights from channelopathies and mouse models. In: *Mol. Neurobiol.* 35 (2007), Jun, Nr. 3, S. 266–277
- [Blachly-Dyson und Forte 2001] BLACHLY-DYSON, E. ; FORTE, M.: VDAC channels. In: *IUBMB Life* 52 (2001), Nr. 3-5, S. 113–118
- [Blaustein und Lederer 1999] BLAUSTEIN, M. P. ; LEDERER, W. J.: Sodium/calcium exchange: its physiological implications. In: *Physiol. Rev.* 79 (1999), Jul, Nr. 3, S. 763–854

- [Blount und Moe 1999] BLOUNT, P. ; MOE, P. C.: Bacterial mechanosensitive channels: integrating physiology, structure and function. In: *Trends Microbiol.* 7 (1999), Oct, Nr. 10, S. 420–424
- [Blount u. a. 1996] BLOUNT, P. ; SUKHAREV, S. I. ; MOE, P. C. ; SCHROEDER, M. J. ; GUY, H. R. ; KUNG, C.: Membrane topology and multimeric structure of a mechanosensitive channel protein of *Escherichia coli*. In: *EMBO J.* 15 (1996), Sep, Nr. 18, S. 4798–4805
- [Borecky u. a. 1997] BORECKY, J. ; JEZEK, P. ; SIEMEN, D.: 108-pS channel in brown fat mitochondria might be identical to the inner membrane anion channel. In: *J. Biol. Chem.* 272 (1997), Aug, Nr. 31, S. 19282–19289
- [Borst und Elferink 2002] BORST, P. ; ELFERINK, R. O.: Mammalian ABC transporters in health and disease. In: *Annu. Rev. Biochem.* 71 (2002), S. 537–592
- [Cannon 2006] CANNON, S. C.: Pathomechanisms in channelopathies of skeletal muscle and brain. In: *Annu. Rev. Neurosci.* 29 (2006), S. 387–415
- [Catterall u. a. 2008] CATTERALL, W. A. ; DIB-HAJJ, S. ; MEISLER, M. H. ; PIETROBON, D.: Inherited neuronal ion channelopathies: new windows on complex neurological diseases. In: *J. Neurosci.* 28 (2008), Nov, Nr. 46, S. 11768–11777
- [Coronado und Latorre 1983] CORONADO, R. ; LATORRE, R.: Phospholipid bilayers made from monolayers on patch-clamp pipettes. In: *Biophys. J.* 43 (1983), Aug, Nr. 2, S. 231–236
- [Cruickshank u. a. 1997] CRUICKSHANK, C. C. ; MINCHIN, R. F. ; LE DAIN,

- A. C. ; MARTINAC, B.: Estimation of the pore size of the large-conductance mechanosensitive ion channel of *Escherichia coli*. In: *Biophys. J.* 73 (1997), Oct, Nr. 4, S. 1925–1931
- [Deng u. a. 2014] DENG, D. ; XU, C. ; SUN, P. ; WU, J. ; YAN, C. ; HU, M. ; YAN, N.: Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. In: *Nature* 510 (2014), Jun, Nr. 7503, S. 121–125
- [Downey u. a. 2007] DOWNEY, J. M. ; DAVIS, A. M. ; COHEN, M. V.: Signaling pathways in ischemic preconditioning. In: *Heart Fail Rev* 12 (2007), Dec, Nr. 3-4, S. 181–188
- [Doyle u. a. 1998] DOYLE, Declan A. ; CABRAL, Joao M. ; PFUETZNER, Richard A. ; KUO, Anling ; GULBIS, Jacqueline M. ; COHEN, Steven L. ; CHAIT, Brian T. ; MACKINNON, Roderick: The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. In: *Science* 280(69) (1998), S. 69–77
- [Dunlop u. a. 2008] DUNLOP, J. ; BOWLBY, M. ; PERI, R. ; VASILYEV, D. ; ARIAS, R.: High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. In: *Nat Rev Drug Discov* 7 (2008), Apr, Nr. 4, S. 358–368
- [Fenske u. a. 2011] FENSKE, S ; MADER, R ; SCHARR, A ; C, C P. ; CAO-EHLKER, X ; MICHALAKIS, S ; SHALTIEL, L ; WEIDINGER, M ; STIEBER, J ; FEIL, S ; FEIL, R ; HOFMANN, F ; WAHL-SCHOTT, C ; BIEL, M: HCN3 contributes to the ventricular action potential waveform in the murine heart. In: *Circulation Research* 109(9) (2011)
- [Fieni u. a. 2012] FIENI, F. ; LEE, S. B. ; JAN, Y. N. ; KIRICHOK, Y.: Acti-

vity of the mitochondrial calcium uniporter varies greatly between tissues.
In: *Nat Commun* 3 (2012), S. 1317

[Frezza u. a. 2007] FREZZA, C ; CIPOLAT, S ; SCORRANO, L: Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. In: *Nature Protocols* 2: 287-295 (2007)

[Geibel u. a. 2006] GEIBEL, S. ; FLORES-HERR, N. ; LICHER, T. ; VOL-
LERT, H.: Establishment of cell-free electrophysiology for ion transporters:
application for pharmacological profiling. In: *J Biomol Screen* 11 (2006),
Apr, Nr. 3, S. 262–268

[Grewer u. a. 2013] GREWER, C. ; GAMEIRO, A. ; MAGER, T. ; FENDLER,
K.: Electrophysiological characterization of membrane transport proteins.
In: *Annu Rev Biophys* 42 (2013), S. 95–120

[Gruswitz u. a. 2010] GRUSWITZ, F. ; CHAUDHARY, S. ; HO, J. D. ; SCHLES-
SINGER, A. ; PEZESHKI, B. ; HO, C. M. ; SALI, A. ; WESTHOFF, C. M. ;
STROUD, R. M.: Function of human Rh based on structure of RhC at 2.1
Å. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (2010), May, Nr. 21, S. 9638–9643

[Hamill und Martinac 2001] HAMILL, O. P. ; MARTINAC, B.: Molecular
basis of mechanotransduction in living cells. In: *Physiol. Rev.* 81 (2001),
Apr, Nr. 2, S. 685–740

[Hase u. a. 1995] HASE, C. C. ; LE DAIN, A. C. ; MARTINAC, B.: Purification
and functional reconstitution of the recombinant large mechanosensitive
ion channel (MscL) of *Escherichia coli*. In: *J. Biol. Chem.* 270 (1995),
Aug, Nr. 31, S. 18329–18334

- [Iwamoto und Shigekawa 1998] IWAMOTO, T. ; SHIGEKAWA, M.: Differential inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms by divalent cations and isothiourea derivative. In: *Am. J. Physiol.* 275 (1998), Aug, Nr. 2 Pt 1, S. C423–430
- [Jegla u. a. 2009] JEGLA, T. J. ; ZMASEK, C. M. ; BATALOV, S. ; NAYAK, S. K.: Evolution of the human ion channel set. In: *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 12 (2009), Jan, Nr. 1, S. 2–23
- [Kelety u. a. 2006] KELETY, B. ; DIEKERT, K. ; TOBIEN, J. ; WATZKE, N. ; DORNER, W. ; OBRDLIK, P. ; FENDLER, K.: Transporter assays using solid supported membranes: a novel screening platform for drug discovery. In: *Assay Drug Dev Technol* 4 (2006), Oct, Nr. 5, S. 575–582
- [Keller und Hedrich 1992] KELLER, B. U. ; HEDRICH, R.: Patch clamp techniques to study ion channels from organelles. In: *Meth. Enzymol.* 207 (1992), S. 673–681
- [Khananshvili 2013] KHANANSHVILI, D.: The SLC8 gene family of sodium-calcium exchangers (NCX) - structure, function, and regulation in health and disease. In: *Mol. Aspects Med.* 34 (2013), Nr. 2-3, S. 220–235
- [Kirichok u. a. 2004] KIRICHOK, Y. ; KRAPIVINSKY, G. ; CLAPHAM, D. E.: The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. In: *Nature* 427 (2004), Jan, Nr. 6972, S. 360–364
- [Ko u. a. 2009] KO, J. H. ; IBRAHIM, M. A. ; PARK, W. S. ; KO, E. A. ; KIM, N. ; WARDA, M. ; LIM, I. ; BANG, H. ; HAN, J.: Cloning of large-conductance Ca(2⁺)-activated K(+) channel alpha-subunits in mouse car-

diomyocytes. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389 (2009), Nov, Nr. 1, S. 74–79

[Kocer u. a. 2007] KOCER, A. ; WALKO, M. ; FERINGA, B. L.: Synthesis and utilization of reversible and irreversible light-activated nanovalves derived from the channel protein MscL. In: *Nat Protoc* 2 (2007), Nr. 6, S. 1426–1437

[Koprowski und Kubalski 2001] KOPROWSKI, P. ; KUBALSKI, A.: Bacterial ion channels and their eukaryotic homologues. In: *Bioessays* 23 (2001), Dec, Nr. 12, S. 1148–1158

[Krause u. a. 2009] KRAUSE, R. ; WATZKE, N. ; KELETY, B. ; DORNER, W. ; FENDLER, K.: An automatic electrophysiological assay for the neuronal glutamate transporter mEAAC1. In: *J. Neurosci. Methods* 177 (2009), Feb, Nr. 1, S. 131–141

[Kubalski 1995] KUBALSKI, Andrzej: Generation of giant protoplasts of *Escherichia coli* and an inner-membrane anion selective conductance. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1238(2) (1995), S. 177–82

[Kung u. a. 2010] KUNG, C. ; MARTINAC, B. ; SUKHAREV, S.: Mechanosensitive channels in microbes. In: *Annu. Rev. Microbiol.* 64 (2010), S. 313–329

[Kuo u. a. 2007a] KUO, Mario Meng-Chiang ; BAKER, Kent A. ; WONG, Lee ; CHOE, Senyon: Dynamic oligomeric conversions of the cytoplasmic RCK domains mediate MthK potassium channel activity. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007), S. 2151–2156

- [Kuo u. a. 2007b] KUO, Mario Meng-Chiang ; SAIMI, Yoshiro ; KUNG, Ching ; CHOE, Senyon: Patch Clamp and Phenotypic Analyses of a Prokaryotic Cyclic Nucleotide-gated K⁺ Channel Using *Escherichia coli* as a Host. In: *The Journal of Biological Chemistry* 282(33) (2007), S. 24294–24301
- [Lehnart u. a. 2007] LEHNART, S. E. ; ACKERMAN, M. J. ; BENSON, D. W. ; BRUGADA, R. ; CLANCY, C. E. ; DONAHUE, J. K. ; GEORGE, A. L. ; GRANT, A. O. ; GROFT, S. C. ; JANUARY, C. T. ; LATHROP, D. A. ; LEDERER, W. J. ; MAKIELSKI, J. C. ; MOHLER, P. J. ; MOSS, A. ; NERBONNE, J. M. ; OLSON, T. M. ; PRZYWARA, D. A. ; TOWBIN, J. A. ; WANG, L. H. ; MARKS, A. R.: Inherited arrhythmias: a National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Rare Diseases workshop consensus report about the diagnosis, phenotyping, molecular mechanisms, and therapeutic approaches for primary cardiomyopathies of gene mutations affecting ion channel function. In: *Circulation* 116 (2007), Nov, Nr. 20, S. 2325–2345
- [Liao u. a. 2012] LIAO, J. ; LI, H. ; ZENG, W. ; SAUER, D. B. ; BELMARES, R. ; JIANG, Y.: Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger. In: *Science* 335 (2012), Feb, Nr. 6069, S. 686–690
- [Locher u. a. 2002] LOCHER, K. P. ; LEE, A. T. ; REES, D. C.: The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. In: *Science* 296 (2002), May, Nr. 5570, S. 1091–1098
- [Martinac 2007] MARTINAC, B. ; HAMILL, O.P. (Hrsg.): *Current Topics in Membranes*. Bd. 58: *Mechanosensitive Ion Channels, Part A*. Academic Press, 2007

- [Martinac u. a. 1987] MARTINAC, Boris ; BUECHNER, Matthew ; DELCOUR, Anne H. ; ADLER, Julius ; KUNG, Ching: Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (84)8 (1987)
- [Montal und Mueller 1972] MONTAL, M. ; MUELLER, P.: Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69 (1972), Dec, Nr. 12, S. 3561–3566
- [Mueller u. a. 1962] MUELLER, P. ; RUDIN, D. O. ; TIEN, H. T. ; WESCOTT, W. C.: Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. In: *Nature* 194 (1962), Jun, S. 979–980
- [Murakami u. a. 2002] MURAKAMI, S. ; NAKASHIMA, R. ; YAMASHITA, E. ; YAMAGUCHI, A.: Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. In: *Nature* 419 (2002), Oct, Nr. 6907, S. 587–593
- [Murry u. a. 1986] MURRY, C. E. ; JENNINGS, R. B. ; REIMER, K. A.: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. In: *Circulation* 74 (1986), Nov, Nr. 5, S. 1124–1136
- [Neher und Sackmann 1976] NEHER, E. ; SACKMANN, B.: Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. In: *Nature* 260 (1976), Apr, Nr. 5554, S. 799–802
- [Nishida u. a. 2010] NISHIDA, H. ; MATSUMOTO, A. ; TOMONO, N. ; HANAKAI, T. ; HARADA, S. ; NAKAYA, H.: Biochemistry and physiology of mitochondrial ion channels involved in cardioprotection. In: *FEBS Lett.* 584 (2010), May, Nr. 10, S. 2161–2166

- [Nutt u. a. 2004] NUTT, J. G. ; CARTER, J. H. ; SEXTON, G. J.: The dopamine transporter: importance in Parkinson's disease. In: *Ann. Neurol.* 55 (2004), Jun, Nr. 6, S. 766–773
- [O'Rourke u. a. 2005] O'ROURKE, B. ; CORTASSA, S. ; AON, M. A.: Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. In: *Physiology (Bethesda)* 20 (2005), Oct, S. 303–315
- [Ottolia u. a. 2013] OTTOLIA, M. ; TORRES, N. ; BRIDGE, J. H. ; PHILIPSON, K. D. ; GOLDBABER, J. I.: Na/Ca exchange and contraction of the heart. In: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 61 (2013), Aug, S. 28–33
- [Philipson und Nicoll 2000] PHILIPSON, K. D. ; NICOLL, D. A.: Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. In: *Annu. Rev. Physiol.* 62 (2000), S. 111–133
- [Pietrobon und Striessnig 2003] PIETROBON, D. ; STRIESSNIG, J.: Neurobiology of migraine. In: *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (2003), May, Nr. 5, S. 386–398
- [Pignataro u. a. 2004] PIGNATARO, G. ; GALA, R. ; CUOMO, O. ; TORTIGLIONE, A. ; GIACCIO, L. ; CASTALDO, P. ; SIRABELLA, R. ; MATRONE, C. ; CANITANO, A. ; AMOROSO, S. ; DI RENZO, G. ; ANNUNZIATO, L.: Two sodium/calcium exchanger gene products, NCX1 and NCX3, play a major role in the development of permanent focal cerebral ischemia. In: *Stroke* 35 (2004), Nov, Nr. 11, S. 2566–2570
- [Pintschovius und Fendler 1999] PINTSCHOVIVS, J. ; FENDLER, K.: Charge translocation by the Na⁺/K⁺-ATPase investigated on solid supported

membranes: rapid solution exchange with a new technique. In: *Biophys. J.* 76 (1999), Feb, Nr. 2, S. 814–826

[Powers und Beavis 1991] POWERS, M. F. ; BEAVIS, A. D.: Triorganotins inhibit the mitochondrial inner membrane anion channel. In: *J. Biol. Chem.* 266 (1991), Sep, Nr. 26, S. 17250–17256

[Remaut und Fronzes 2014] REMAUT, Han (Hrsg.) ; FRONZES, Remi (Hrsg.): *Bacterial Membranes: Structural and Molecular Biology*. Caister Academic Press, 2014

[Sackmann und Neher 2009] SACKMANN, Bert (Hrsg.) ; NEHER, Erwin (Hrsg.): *Single-Channel Recording, Second Edition*. Plenum Press, 2009

[Sanguinetti und Tristani-Firouzi 2006] SANGUINETTI, M. C. ; TRISTANI-FIROUZI, M.: hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. In: *Nature* 440 (2006), Mar, Nr. 7083, S. 463–469

[Sato u. a. 2005] SATO, T. ; SAITO, T. ; SAEGUSA, N. ; NAKAYA, H.: Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. In: *Circulation* 111 (2005), Jan, Nr. 2, S. 198–203

[Scheffler 2001] SCHEFFLER, I. E.: A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. In: *Mitochondrion* 1 (2001), Jun, Nr. 1, S. 3–31

[Seifert u. a. 1993] SEIFERT, K. ; FENDLER, K. ; BAMBERG, E.: Charge transport by ion translocating membrane proteins on solid supported membranes. In: *Biophys. J.* 64 (1993), Feb, Nr. 2, S. 384–391

- [Sharma und O'Halloran 2014] SHARMA, V. ; O'HALLORAN, D. M.: Recent structural and functional insights into the family of sodium calcium exchangers. In: *Genesis* 52 (2014), Feb, Nr. 2, S. 93–109
- [Siemen u. a. 1999] SIEMEN, D ; LOUPATATZIS, C ; BORECKY, J ; GULBINS, E ; LANG, F: Ca²⁺-activated K channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. In: *Biochem Biophys Res Commun* 257: 74-79 (1999)
- [Singh u. a. 2013] SINGH, H. ; LU, R. ; BOPASSA, J. C. ; MEREDITH, A. L. ; STEFANI, E. ; TORO, L.: MitoBK(Ca) is encoded by the Kcnmal gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (2013), Jun, Nr. 26, S. 10836–10841
- [Soltysinska u. a. 2014] SOLTYSINSKA, E. ; BENTZEN, B. H. ; BARTHMES, M. ; HATTEL, H. ; THRUSH, A. B. ; HARPER, M. E. ; QVORTRUP, K. ; LARSEN, F. J. ; SCHIFFER, T. A. ; LOSA-REYNA, J. ; STRAUBINGER, J. ; KNISS, A. ; THOMSEN, M. B. ; BRUGGEMANN, A. ; FENSKE, S. ; BIEL, M. ; RUTH, P. ; WAHL-SCHOTT, C. ; BOUSHEL, R. C. ; OLESEN, S. P. ; LUKOWSKI, R.: KCNMA1 Encoded Cardiac BK Channels Afford Protection against Ischemia-Reperfusion Injury. In: *PLoS ONE* 9 (2014), Nr. 7, S. e103402
- [Szabo und Zoratti 2014] SZABO, I. ; ZORATTI, M.: Mitochondrial channels: ion fluxes and more. In: *Physiol. Rev.* 94 (2014), Apr, Nr. 2, S. 519–608
- [Tadini-Buoninsegni u. a. 2008] TADINI-BUONINSEGNI, F. ; BARTOLOMMEI, G. ; MONCELLI, M. R. ; TAL, D. M. ; LEWIS, D. ; INESI, G.: Effects of high-affinity inhibitors on partial reactions, charge movements, and conforma-

tional States of the Ca²⁺ transport ATPase (sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. In: *Mol. Pharmacol.* 73 (2008), Apr, Nr. 4, S. 1134–1140

[Toyoshima u. a. 2000] TOYOSHIMA, C. ; NAKASAKO, M. ; NOMURA, H. ; OGAWA, H.: Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. In: *Nature* 405 (2000), Jun, Nr. 6787, S. 647–655

[Triggle u. a. 2006] TRIGGLE, D. (Hrsg.) ; GOPALAKRISHNAN, M. (Hrsg.) ; RAMPE, D. (Hrsg.) ; ZHENG, W. (Hrsg.): *Voltage-Gated Ion Channels as Drug Targets*. Wiley-VCH, 2006 (Methods and Principles in Medicinal Chemistry, Volume 29)

[Vogalis u. a. 2000] VOGALIS, F. ; HILLSLEY, K. ; SMITH, T. K.: Diverse ionic currents and electrical activity of cultured myenteric neurons from the guinea pig proximal colon. In: *J. Neurophysiol.* 83 (2000), Mar, Nr. 3, S. 1253–1263

[Wadiche und Kavanaugh 1998] WADICHE, J. I. ; KAVANAUGH, M. P.: Macroscopic and microscopic properties of a cloned glutamate transporter/chloride channel. In: *J. Neurosci.* 18 (1998), Oct, Nr. 19, S. 7650–7661

[Wang u. a. 2004] WANG, X. ; YIN, C. ; XI, L. ; KUKREJA, R. C.: Opening of Ca²⁺-activated K⁺ channels triggers early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice. In: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287 (2004), Nov, Nr. 5, S. H2070–2077

[Watzke u. a. 2010] WATZKE, N. ; DIEKERT, K. ; OBRDLIK, P.: Electrophysiology of respiratory chain complexes and the ADP-ATP exchanger in native mitochondrial membranes. In: *Biochemistry* 49 (2010), Dec, Nr. 48, S. 10308–10318

- [Withold u. a. 1976] WITHOLD, Bernard ; BOEKHOUT, Mieke ; BROCK, Martin ; KINGMA, Jaap ; HEERIKHUIZEN, Harm van ; LEIJ, Loe de: An Efficient and Reproducible Procedure for the Formation of Spheroplasts from Variously Grown Escherichia coli. In: *Analytical Biochemistry* 74 (1976), S. 160–170
- [Wright u. a. 2011] WRIGHT, E. M. ; LOO, D. D. ; HIRAYAMA, B. A.: Biology of human sodium glucose transporters. In: *Physiol. Rev.* 91 (2011), Apr, Nr. 2, S. 733–794
- [Xu u. a. 2002] XU, W. ; LIU, Y. ; WANG, S. ; McDONALD, T. ; VAN EYK, J. E. ; SIDOR, A. ; O’ROURKE, B.: Cytoprotective role of Ca²⁺- activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. In: *Science* 298 (2002), Nov, Nr. 5595, S. 1029–1033
- [Yellon und Downey 2003] YELLON, D. M. ; DOWNEY, J. M.: Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. In: *Physiol. Rev.* 83 (2003), Oct, Nr. 4, S. 1113–1151. – Preconditioning, mitochondria
- [Yu und Catterall 2004] YU, F.H. ; CATTERALL, W.A.: The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. In: *Science Signaling* 253 (2004)
- [Zhang u. a. 2014] ZHANG, Q. ; DOU, J. ; LU, J.: Combinational therapy with metformin and sodium-glucose cotransporter inhibitors in management of type 2 diabetes: systematic review and meta-analyses. In: *Diabetes Res. Clin. Pract.* 105 (2014), Sep, Nr. 3, S. 313–321

7 Publikationen

Journalpaper und Buchkapitel

- **BARTHME** M, JOSE MD, BIRKNER JP, BRÜGGEMANN A, WAHL-SCHOTT C, KOÇER A. (2014), Studying mechanosensitive ion channels with automated patch clamp, *Eur. Biophys. J* 43, 97-104
- SOLTYSINSKA E, BENTZEN BH, **BARTHME** M, HATTEL H, THRUSH AB, HARPER ME, QVORTRUP K, LARSEN FJ, SCHIFFER TA, LOSAREYNA J, STRAUBINGER J, KNISS A, BÆKGAARD THOMSEN M, BRÜGGEMANN A, FENSKE S, BIEL M, RUTH P, WAHL-SCHOTT C, BOUSHEL RC, OLESEN SP, LUKOWSKI R (2014), KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injuries, *Plos One* 9/7, e103402
- GRIMM C, **BARTHME** M, WAHL-SCHOTT C (2014), TRPML3, *Handbook of Experimental Pharmacology* 222, 659-674

8 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Professor Martin Biel für seine Unterstützung und die Möglichkeit diese Arbeit am Department Pharmazie durchzuführen!

Besonders dankbar bin ich Professor Christian Wahl-Schott für die Betreuung dieser Arbeit, seine stetige Förderung und Unterstützung. Danke für Deine Flexibilität und Dein Verständnis, die die organisatorischen Umstände meiner Arbeit manchmal erfordert haben!

Bei Andrea Brüggemann, Niels Fertig und Michael George bedanke ich mich sehr für die Möglichkeit zu dieser Arbeit. Danke für Euer Vertrauen in mich, und Eure immer ganz selbstverständliche Unterstützung! Danke an das ganze Nanion-Team für Eure Freundschaft und Solidarität in den vergangenen Jahren! Rock 'n' Roll Realschule!

Danke an Michael Schieder, Cheng-Chang Maxo Chen, Sami Hassan, Stefanie Fenske, Stefanie Krause, Verena Hammelmann, Christian Grimm und Christos Paparizos für die Einarbeitung und Hilfe bei vielen Themen und Fragen!

Ohne Sebastian, Andrea, Franziska und meine Familie hätte ich es nicht bis hierher geschafft. Danke, dass Ihr immer für mich da seid!