1.2 Der BK-Kanal

Die Klonierung eines BK-Kanals erfolgte zuerst aus *Drosophila* (Atkinson *et al*.,1991; Adelman *et al*., 1992); Ausgangspunkt war die Mutante *Slowpoke* (Elkins *et al*., 1986), daher die häufig anzutreffende Abkürzung *Slo*. In der Folgezeit wurden zu *dSlo* homologe Gene auch in anderen Spezies identifiziert, z.B. der Maus, der Ratte und dem Menschen (Butler *et al*., 1993; Tseng-Crank *et al*., 1994; Hülsemann, 1998). Ein BK-Kanal hat bei symmetrischer K^+-Konzentration eine Leitfähigkeit von ca. 250 pS (Wallner *et al*., 1999a). Die membranspannende Region S1 - S6 des BK ist zu den spannungsaktivierten Kaliumkanälen homolog; BK verfügt jedoch über eine weitere N-terminale Transmembrandomäne (S0) und einen über 800 Aminosäuren langen intrazellulären C-Terminus, der weitere hydrophobe Segmente (S7 - S10) enthält (Adelman *et al*., 1992; Butler *et al*., 1993; Meera *et al*., 1997). Während an die SK-Kanäle konstitutiv Calmodulin als Ca^{2+}-Sensor gebunden ist (Xia *et al*., 1998a), wurde beim BK-Kanal ein Sequenzabschnitt im C-Terminus identifiziert, der aufgrund der vielen negativ geladenen Aspartatreste eine potentielle Ca^{2+}-Bindungsstelle darstellt und an der Regulation des Kanals durch Ca^{2+} einen wesentlichen Anteil hat. Die Region wird als „*calcium bowl*“ bezeichnet und befindet sich zwischen S9 und S10 (Schreiber und Salkoff, 1997; Schreiber *et al*., 1999).

Obwohl nur ein Gen bekannt ist, das für die α-Untereinheit von BK-Kanälen kodiert, wurden native BK-Kanäle mit sehr unterschiedlicher Ca^{2+}-Sensitivität, Kinetik und Sensitivität gegenüber Toxinen beschrieben (Reinhart *et al*., 1989; McManus, 1991). Ein bedeutsamer Mechanismus, um BK-Kanäle mit variablen Eigenschaften zu erzeugen, ist das alternative Spleißen an mindestens 5 Stellen innerhalb des intrazellulären C-Terminus des BK-Kanals von Säugetieren (Butler *et al*., 1993; Tseng-Crank *et al*., 1994; Vogalis *et al*., 1996; Wallner *et al*., 1999a). Bei Spleißvarianten wurde eine veränderte apparente Ca^{2+}-Sensitivität (Tseng-Crank *et al*., 1994) bzw. durch ein cysteinreiches Exon eine erhöhte apparente Ca^{2+}-Sensitivität und eine veränderte Kinetik beobachtet (Saito *et al*., 1997). Darüber hinaus tragen β-Untereinheiten, Proteine mit zwei Transmembrandomänen und intrazellulären N- und C-Termini, zur Vielfalt nativer BK-Känale bei. Die erste β-Untereinheit wurde als Bestandteil des gereinigten BK-Kanals aus der glatten Muskulatur identifiziert und kloniert (Knaus *et al*., 1994). Diese Untereinheit, die überwiegend in der glatten Muskulatur exprimiert wird, erhöht die Ca^{2+}- und Iberiotoxin-Sensitivität und verlangsamt die Kinetik der

Aktivierung und Deaktivierung des BK-Kanals (Dworetzky *et al.*, 1996). Für die Vermittlung des Effekts der β-Untereinheit ist die N-terminale Region des BK-Kanals bis einschließlich S0 erforderlich (Wallner *et al.*, 1996). Koexpression von BK mit einer anderen β-Untereinheit (β2; Wallner *et al.*, 1999b; Xia *et al.*, 1999) führt dazu, daß der Kanal inaktivierend und außerdem sensitiver gegenüber Charybdotoxin wird ($IC_{50}(\alpha)$ = 1 nM; $IC_{50}(\alpha+\beta2)$ = 58 nM; Wallner *et al.*, 1999b). In den Haarzellen des Innenohrs des Huhnes wirken alternatives Spleißen der α-Untereinheit und eine β-Untereinheit zusammen, um BK-Kanäle mit verschiedener Kinetik und Ca^{2+}-Sensitivität zu generieren. Es wird vermutet, daß die unterschiedliche Verteilung von BK-Spleißvarianten und die Variationen im Expressionsniveau der β-Untereinheit in der Cochlea dazu dienen, die elektrischen Eigenschaften der verschiedenen Haarzellen an die Schallfrequenz, die sie verstärken sollen, anzupassen (Navaratnam *et al.*, 1997; Rosenblatt *et al.*, 1997; Ramanathan *et al.*, 1999).

1.3 Physiologische Funktionen des BK-Kanals

Da unter physiologischen Bedingungen gleichzeitig ein depolarisiertes Membranpotential und eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration erforderlich sind, um BK zu aktivieren (Marty, 1981), fungiert der Kanal in der Zelle als ein Koinzidenzdetektor. Seine Aktivierung repolarisiert die Plasmamembran, wodurch u.a. der Calciumeinstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle (Ca_v-Kanäle) beendet wird, ein Vorgang, der in der Kybernetik als negative Rückkopplung bezeichnet wird (Vergara *et al.*, 1998). Eine Aktivierung von BK-Kanälen durch Ca^{2+}-Kanäle des N-Typs, aber nicht durch solche des L- oder P/Q-Typs, wurde mit *patch clamp*-Messungen an Hippocampus-Neuronen gezeigt (Marrion und Tavalin, 1998). In SCG-Neuronen sind BK-Kanäle hingegen mit Ca^{2+}-Kanälen des L-Typs gekoppelt (Davies *et al.*, 1996). BK-Kanäle tragen zur Repolarisierung nach einem Aktionspotential sowie zum schnellen hyperpolarisierenden Nachpotential (fAHP) bei (Storm, 1987; Sah, 1996). Sie regulieren die Ausschüttung von Neurotransmittern an der neuromuskulären Synapse des Frosches (Robitaille und Charlton, 1992). Aus den Ergebnissen der Immunhistochemie und *in situ*-Hybridisierung wurde abgeleitet, daß im zentralen Nervensystem der Ratte viele BK-Kanäle in den Axonen und Nervenendigungen lokalisiert sind, und es wird vermutet, daß präsynaptische BK-Kanäle im Gehirn ebenfalls an der Regulation der Neurotransmitter-Ausschüttung beteiligt sein könnten (Knaus *et al.*, 1996).

BK-Kanäle sind in der glatten Muskulatur stark exprimiert (Knaus *et al*., 1995) und spielen hier eine wichtige Rolle bei der Regulation des Kontraktionszustandes (Wallner *et al*., 1999a). Die Blockierung der BK-Kanäle führt zur Depolarisierung der Muskelzellen und zur Kontraktion des Muskels (Brayden und Nelson, 1992; Anwer *et al*., 1993). In der glatten Muskulatur von Arterien können BK-Kanäle infolge von lokalen Erhöhungen der Ca^{2+}-Konzentration aktiviert werden, die von Ca^{2+}-abhängigen Ca^{2+}-Kanälen im sarkoplasmatischen Retikulum verursacht werden, und so die Zellen hyperpolarisieren und den Muskel entspannen (Nelson *et al*., 1995)

1.4 Potentielle Interaktionspartner des BK-Kanals von Säugetieren

Die präzise Lokalisierung von Ionenkanälen in der Plasmamembran, z.B. im Verbund mit anderen Ionenkanälen, in der Prä- oder Postsynapse, ist für deren Funktion *in vivo* essentiell, und wird meist durch deren direkte Interaktion mit Struktur- oder Adapterproteinen erreicht (Sheng und Wyszynski, 1997). Die hohen Ca^{2+}-Konzentrationen (im mikromolaren Bereich), die für die Aktivierung des BK-Kanals unter physiologischen Bedingungen erforderlich sind, deuten darauf hin, daß sich BK- und spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle in großer Nähe zueinander befinden sollten. Darüber hinaus zeigten *patch clamp*-Messungen an Neuronen des Hippocampus, daß im gleichen *patch* befindliche Ca^{2+}-Kanäle des L-Typs und BK-Kanäle nahezu zeitgleich aktivieren, was ebenfalls auf einen sehr geringen Abstand zwischen den Kanälen schließen läßt (Marrion und Tavalin, 1998). Eine Kolokalisierung von BK-Kanälen und spannungsabhängigen Ca^{2+}-Kanälen wurde auch in Neuronen der Schnecke (Gola und Crest, 1993), an der neuromuskulären Synapse des Frosches (Robitaille *et al*., 1993) und in Haarzellen des Frosches nachgewiesen (Roberts *et al*., 1990; Issa und Hudspeth, 1994). Unbekannt sind jedoch die molekularen Strukturen, die für die räumliche Organisation dieser Ionenkanäle verantwortlich sind.

Bei der elektrophysiologischen Charakterisierung nativer BK-Kanäle aus dem Gehirn der Ratte wurde festgestellt, daß Proteinkinase C sowie die Phosphoprotein-Phosphatase 2A mit dem gereinigten Kanal assoziiert sind (Chung *et al*., 1991; Reinhart und Levitan, 1995). Des weiteren können sowohl die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A als auch die Tyrosinkinase Src den BK-Kanal aus *Drosophila* nicht nur phosphorylieren, sondern auch physikalisch mit ihm interagieren (Wang *et al*., 1999).

Außerdem wurden mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems in der Hefe („*yeast two-hybrid screen*“) zwei bis dahin unbekannte, regulatorische Proteine gefunden (Slob und dSlip), die mit dem BK-Kanal aus *Drosophila* interagieren (Schopperle *et al*., 1998; Xia *et al*., 1998b). Während Slob allein die Sensitivität von BK gegenüber der Depolarisation des Membranpotentials erhöht, kehrt die Assoziation eines weiteren regulatorischen Proteins, einer 14-3-3-Isoform, mit Slob den Effekt um und erhöht die Spannungssensitivität des Kanals (Zhou *et al*., 1999). Die Bindung von 14-3-3 an Slob ist dynamisch regulierbar, da sie von der Phosphorylierung zweier Serinreste in Slob durch die Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II abhängt (Zhou *et al*., 1999). Allerdings konnten bis heute keine zu Slob oder dSlip homologen Vertebraten-Proteine gefunden werden.

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Bisher sind, mit Ausnahme der β-Untereinheiten, keine Proteine bekannt, die mit dem BK-Kanal von Vertebraten physikalisch interagieren. Nicht nur die in den letzten Jahren herausgearbeiteten Prinzipien der Signalübertragung und der räumlichen Organisation der Zelle, sondern auch das Beispiel des BK-Kanals aus *Drosophila* und die erwähnten experimentellen Befunde bezüglich des homologen Säugetier-Kanals lassen jedoch den Schluß zu, daß solche Interaktionspartner existieren und für die physiologischen Funktionen des Ionenkanals bedeutsam sind. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung eines bislang unbekannten Proteins, das mit dem C-Terminus des BK-Kanals der Ratte interagiert.