1 Einleitung

Kaliumkanäle spielen in der Zellmembran von erregbaren Zellen des Nervensystems, sowie von Herz- und Muskelzellen eine fundamentale Rolle. Sie sind dort unter anderem für die Aufrechterhaltung des Membranruhepotentials verantwortlich, halten schnelle Aktionspotentiale kurz, beenden Phasen hoher Aktivität, bestimmen die Aktionspotentialfrequenz und erschweren im allgemeinen die Weiterleitung von erregenden Signalen auf eine Zelle (Hille, 1992).

In einer Zelle sind die unterschiedlichsten Arten von Ionenkanälen vorhanden und es ist deshalb sehr schwer, den einzelnen Beitrag jedes Typs zum Gesamtstromaufkommen zu ermitteln. In nahezu jeder untersuchten Zelle konnten Kaliumströme identifiziert werden. Eine genaue Zuordnung zu bestimmten Kaliumkanälen bzw. Kaliumkanalfamilien ist jedoch kompliziert. Ein gut untersuchtes System für die Charakterisierung von Kaliumströmen in Neuronen stellen die Pyramidenzellen des Hippocampus in Vertebaten dar. In den CA1-Pyramidenzellen wurden mehrere unterschiedliche Kaliumströme beschrieben, von denen vier spannungsabhängig sind, einer Ca^{2+}-abhängig und einer sowohl spannungs- als auch Ca^{2+}-abhängig ist (Storm,1990).

1.1 Spannungsabhängige Ca^{2+}-unabhängige Kaliumströme:

Der Kaliumstrom I_A wurde als erstes in CA3-Zellen des adulten Meerschweinchen-Hippocampus beschrieben (Gustafsson *et al.*, 1982). Der I_A, welcher durch Depolarisationen auf Potentiale positiver als –60 mV aktiviert wird, weist eine schnelle Aktvierungs- und Inaktivierungskinetik auf. Der I_A-Strom in den CA1-Pyramidenneuronen der Ratte zeichnet sich pharmakologisch durch seine Sensitivität gegenüber 4-Aminopyridin und dem Schlangengift Dendrotoxin aus. Aufgrund der schnellen Aktivierung trägt der I_A-Strom wesentlich zur initialen Phase der Repolarisation des Aktionspotentials bei (Storm, 1987).

In CA1-Pyramidenzellen der Ratte wurde der verzögerte Kaliumstrom I_D (*delayed current*) beschrieben (Storm, 1988), der in diesem Zelltyp mit dem schnelleren Strom I_A koexistiert. Der I_D-Strom wird durch Depolarisation auf Potentiale positiver als –70 mV aktiviert, und weist im Gegensatz zum I_A eine langsamere Kinetik auf; besonders in der Phase der Inaktivierung. Pharmakologisch zeichnet sich der I_D-Strom durch eine höhere Sensitivität gegenüber 4-Aminopyridin aus. Die relativ schnelle Aktivierung läßt

vermuten, daß auch der I_D-Strom für die Repolarisationphase mitverantwortlich ist (Storm, 1990).

Der verzögerte gleichrichtende Kaliumstrom I_K (*delayed rectifier*) wurde ebenfalls in CA1-Zellen adulter Ratten beschrieben (Madison *et al.*, 1987). Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen I_A- und I_D-Strömen wird dieser durch Depolarisation auf Potentiale positiver als –40 mV aktiviert, also nur in der Phase von generierten Aktionspotentialen. Die pharmakologischen Eigenschaften betreffend, zeigt der I_K-Strom eine geringe Sensitivität in bezug auf Tetraethylammonium und eine Insensitivität gegenüber 4-Aminopyridin. Es wird angenommen, daß der I_K-Strom ebenfalls an der Repolarisationsphase der Aktionspotentiale beteiligt ist (Storm, 1988b).

Der I_M-Strom in CA1-Zellen des Rattenhippocampus wurde als einer der ersten beschrieben (Halliwell und Adams, 1982). Die Aktivierung erfolgt hier durch Depolarisation auf Potentiale positiver als –60 mV und sowohl die Aktivierung als auch Deaktivierung sind dabei sehr langsam. Pharmakologisch zeichnet sich der I_M-Strom durch eine Sensitivität gegenüber Tetraethylammonium (TEA), Acetylcholin und anderen muscarinische Agonisten aus. In den Pyramidenzellen des Hippocampus scheint dieser Kaliumstrom mit anderen Kaliumkanälen für die frühe Phase der Adaptation der Feurerungsrate zuständig zu sein, sowie für das mittlere hyperpolarisierende Nachpotential (mAHP, *medium afterhyperpolarisation*), welches jeweils einem Aktionspotential folgt (Madison und Nicoll, 1984).

1.2 Calcium-abhängige Kaliumströme:

In Pyramidenzellen des Hippocampus wurden zwei Ca^{2+}-abhängige Kaliumströme beschrieben, die aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften voneinander unterschieden werden konnten: Der schnelle TEA-sensitive I_C-Strom und der langsame sI_{AHP}, der insensitiv gegenüber TEA ist (Lancaster und Adams, 1986).

In vielen Neuronen folgt auf eine Serie von Aktionpotentialen eine mehrere Sekunden andauernde Hyperpolarisation. Diese Hyperpolarisation kann in drei unterschiedliche Phasen eingeteilt werden. In den Pyramidenzellen des Hippocampus folgt dem Aktionspotential eine schnelle Hyperpolarisation (fAHP, fast AHP), welche im allgemeinen zwischen 1-10 ms dauert und haupsächlich durch den schnellen Ca^{2+}-aktivierten Kaliumstrom I_C hervorgerufen wird (Storm, 1990). Der schnelle I_C-Strom ist sowohl spannungs- als auch Ca^{2+}-abhängig und wird durch Depolarisation auf

Potentiale positiver als –40 mV aktiviert. Die Ca^{2+}-Abhängigkeit des I_C konnte durch Medien mit variablen Ca^{2+}-Konzentrationen oder durch Applikation von Ca^{2+}-Kanalblockern wie Cadmium, Mangan oder Kobalt nachgewiesen werden (Storm, 1985; Lancaster und Adams, 1986). Eine pharmakologische Charakterisierung zeigte, daß der I_C-Strom eine hohe Sensitivität gegenüber TEA und CTX (Charybdotoxin) aufweist.

An die Phase der schnellen Hyperpolarisation schließt sich die des langsamen hyperpolarisierenden Nachpotentials (AHP) an, welche zwischen einigen 100 ms bis zu einigen Sekunden andauern kann. Die hyperpolarisierenden Nachpotentiale können aufgrund ihrer kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften in zwei Gruppen mAHP (*medium AHP*) und sAHP (*slow AHP*) eingeteilt und unterschieden werden (Sah, 1996). Für das in vielen erregbaren Zellen vorkommende schnellere mAHP, das sich durch eine relativ schnelle Aktivierung (< 10ms) und Stromabnahme auszeichnet, ist der Strom I_{AHP} verantwortlich; er ist gegenüber dem Bienengift Apamin sensitiv. Das schnellere hyperpolarisierende Nachpotential spielt eine entscheidende Rolle bei der Determinierung der tonischen Feuerungsrate in Neuronen und ist an der Adaptation der Impulsfrequenz beteiligt (Pennefather *et al.*, 1985). Für das langsamere Nachpotential sAHP, welches die späte Phase der Impulsfrequenzadaption kontrolliert, ist der Strom sI_{AHP} verantwortlich. Im Gegensatz zum mAHP wurde dieses nur in einigen Unterarten von Neuronen, wie zum Beispiel in den CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus beschrieben (Lancaster und Adams, 1986). Das sAHP zeigt eine langsame Aktivierungskinetik (mehrere Sekunden) und der ihm zugrunde liegende sI_{AHP}-Strom ist insensitiv gegenüber dem Bienengift Apamin und anderen K^+-Kanalblockern wie z.B. TEA (Sah, 1996). Eine besondere Eigenschaft des sI_{AHP}-Strom ist seine Modulation durch Monoamine (z.B. Noradrenalin, Serotonin und Dopamin), Acetylcholin und Glutamat, die alle inhibierend wirken (Storm, 1990; Sah, 1996). Neurone bei denen der sI_{AHP} inhibiert ist, weisen eine erhöhte Erregbarkeit auf, die Adaptation der Feurerungsrate ist stark erniedrigt und die Anzahl der generierten Aktionspotentiale bei einem Stimulus stark erhöht (Sah, 1996). Genauere Untersuchungen in CA1-Pyramidenzellen zeigten, daß die Monoamine die cAMP-Konzentration erhöhen und so die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) aktivieren, welche dann letztendlich den sI_{AHP} moduliert (Pedarzani und Storm, 1993).

1.3 Molekulare Diversität der Kaliumkanäle:

Die große Anzahl an Kaliumströmen läßt vermuten, daß ihnen eine ebenso hohe Anzahl verschiedener Kaliumkanäle gegenübersteht. Aufgrund ihrer Membrantopologie werden die Kaliumkanäle in drei Gruppen eingeteilt (Coetzee *et al.*, 1999).

Die erste Gruppe besitzt pro Kanaluntereinheit mit einigen Ausnahmen 6 Transmembrandomänen/–segmente (TMD bzw. S), wobei die Porenregion zwischen S5 und S6 liegt. Es handelt sich bei dieser Gruppe sowohl um spannungsabhängige als auch um spannungs- und Ca^{2+}-abhängige Kaliumkanäle. Eine große Familie bilden die spannungsabhängigen Kv-Kanäle mit den Subfamilien Kv1 bis Kv9 und eine andere große Familie ist die eag-Familie mit den Subfamilien eag, erg und elk. Kleinere Familien umfassen die KQT- (langsam aktvierender verzögerter gleichrichtender Kaliumstrom im Herz), sowie die Ca^{2+}-abhängigen SK- und BK-Kanäle. Die zweite Gruppe umfaßt die Leckstrom-Kaliumkanäle, die 4 Transmembrandomänen sowie zwei Porenregionen je Kanaluntereinheit besitzen; zu ihr gehören die Familien der TWIK-, TREK-, TASK- und TRAAK-Kanäle, die an der Regulierung des Ruhepotentials beteiligt sind. Die dritte große Gruppe besteht aus den einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanälen (Kir) mit zwei Transmembrandomänen, welche in die Subfamilien Kir1 bis Kir7 unterteilt werden (Coetzee *et al.*, 1999).

1.4 Calcium-abhängige Kaliumkanäle:

Die Ca^{2+}-abhängigen Kaliumkanäle können bezüglich ihrer elektrophysiologischen, pharmakologischen und molekularen Eigenschaften in drei Unterfamilien eingeteilt werden: Ca^{2+}- und spannungsabhängige Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK-Kanäle, *big conductance*), Calcium-aktivierte Kaliumkanäle mit mittlerer Leitfähigkeit (IK, *intermediate conductance*) und Calcium-aktivierte Kaliumkanäle mit geringer Leitfähigkeit (SK, *small conductance*) (Vergara *et al.*, 1998).

Eine Mutation in dem für einen Ca^{2+}-abhängigen Kaliumstrom (I_C) kodierenden Locus einer *Drosophila*-Mutante (slowpoke oder slo) war der Startpunkt für die molekulare Identifizierung eines Calcium-abhängigen Kaliumkanals mit hoher Leitfähigkeit (Elkins *et al.*, 1986). Das für den BK-Kanal codierende Gen wurde zunächst aus *Drosophila* kloniert (Atkinson *et al.*, 1991; Adelman *et al.*, 1992) und als dslo bezeichnet. Mit Hilfe dieses Gens gelang es, die dem dslo verwandten Gene aus der Maus (Butler *et al.*, 1993), dem Menschen (Tseng-Crank *et al.*, 1994) und der Ratte (Ha *et al.*, 2000) zu

isolieren. Der BK-Kanal besteht aus einem Komplex zweier unterschiedlicher Untereinheiten; der porenbildenden α-Untereinheit und der regulatorischen β-Untereinheit. Ein funktionfähiger Kanal besteht jeweils aus 4 α- und 4 β-Untereinheiten (Knaus *et al.*, 1994) mit einer Leitfähigkeit von ~ 250 pS in symmetrischem Kalium. Durch Depolarisation und erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen wird der BK-Kanal aktiviert. Die ersten wirksamen BK-Kanalblocker stellten die Toxine Charybdotoxin, und Iberiotoxin dar (Garcia und Kaczorowski, 1998). Die Primärsequenzen verschiedener Säuger-BK-Kanäle ist nahezu identisch. Hydrophobizitätsplots konnten zeigen, daß die Säuger-, *Drosophila*- und *C. elegans*-BK-Kanäle neben den bei spannungsabhängigen Kaliumkanälen üblichen 6 Transmembrandomänen 5 zusätzliche Transmembrandomänen besitzen: Die im aminoterminalen Bereich des Kanalproteins liegende S0-Domäne mit dem extrazellulären N-Terminus und 4 hydrophobe Segmente (S7-S10), die im carboxyterminalen Bereich liegen. (Meera *et al.*, 1997). Trotz der Calcium-Sensitivität der BK-Kanäle findet man keine typischen Ca^{2+}-Bindungsmotive wie zum Beispiel das EF-Handmotiv. Mutationsanalysen in einem 28 AS langem Abschnitt zwischen den S9 und S10 Segmenten lassen aber vermuten, daß diese Region zur Calcium-Bindung nötig ist. Sie besitzt viele negativ geladene Aspartatreste und wird als „*calcium bowl*“ bezeichnet (Schreiber und Salkoff, 1997).

Die ersten Calcium-aktivierte Kaliumkanäle mit geringer Leitfähigkeit (SK) wurden aus den Gehirnen der Ratte und des Menschen kloniert. Isoliert wurde die vollständige Sequenz der rSK2- und rSK3-Untereinheit der Ratte und des hSK1 des Menschen (Köhler *et al.*, 1996) sowie die Sequenz des rSK1 (Longsdon *et al.*,1997). Mit spannungsabhängigen Kaliumkanälen haben sie die 6 Transmembrandomänen umfassende Topologie gemeinsam, mit dem auf der cytoplasmatischen Seite gelegenen N- und C-Terminus und der Porenregion zwischen S5 und S6 (Coetzee *et al.*, 1999).

Innerhalb der SKs findet man eine hohe Konservierung im Bereich der Transmembrandomänen, die zwischen 47 % und 69 % liegt. Im Bereich des intrazellulären Amino- und Carboxy-Terminus ist die Konservierung dagegen äußerst gering (Köhler *et al.*, 1996). Ein Motiv für die Calciumbindung wie z.B. EF-Hand, C2A oder *calcium bowl* konnten in der primären Aminosäuresequenz nicht gefunden werden (Vergara *et al.*, 1998).