

**Aufbau eines pharma-/toxikologischen Testsystems für die Säuger-
Kaliumkanäle mKir2.1 und hERG mit Hilfe des Modellorganismus
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Guido Hasenbrink-Martini

aus Mönchengladbach

Bonn 2007

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: PD Dr. Hella Lichtenberg-Fraté
2. Referent: Prof. Dr. Milan Höfer

Tag der Promotion: 15. Juni 2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Hasenbrink G, Schwarzer S, Kolacna L, Ludwig J, Sychrova H, Lichtenberg-Fraté H. (2005). Analysis of the mKir2.1 channel activity in potassium influx defective *Saccharomyces cerevisiae* strains determined as changes in growth characteristics. *FEBS Lett* **579**, 1723-31.

Hasenbrink G, Kolacna L, Ludwig J, Sychrova H, Kschischo M, Lichtenberg-Frate H (2006). Ring test assessment of the mKir2.1 growth based assay in *Saccharomyces cerevisiae* using parametric models and model-free fits. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, 1212-21.

Kolacna L, Zimmermannova O, Hasenbrink G, Schwarzer S, Ludwig J, Lichtenberg-Fraté H and Sychrova H (2005). Phenotypic analysis of the mKir2.1 channel activity in potassium efflux deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Yeast* **22**, 1315–23.

Abkürzungen und Synonyme

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-Binde-Cassetten
abs.	absolut
amp	Ampicillin
amp ^r	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin „bovine serum albumin“
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cfu	colony forming units
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunucleinacid
EC ₅₀	„median effective concentration“
EtBr	Ethidiumbromid
<i>g</i>	„gravity“ ($g=9,81 \text{ ms}^{-2}$)
GFP	„Green Fluorescent Protein,“
h	Stunde
HIS	Histidin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LEU	Leucin
M	molar
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute(n)
MOPS	3-(4-Morpholino)propansulfonsäure
nm	Nanometer
OD _x	Optische Dichte bei x nm und 1 cm Schichtdicke

pA	pro Analysis
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, „polymerase chain reaction“
PEG	Polyethylenglycol
pH	potentia Hydrogenii bei RT
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
RNA	Ribonukleinsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (22 °C)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
s. o.	siehe oben
s. S.	siehe Seite
Tab.	Tabelle
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N-Tetramethylethylendiamin
tet	Tetracyclin
TM	Transmembrandomäne(n)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRP	Tryptophan
u	Einheit der Enzymaktivität, „unit(s)“
URA	Uracil
UV	ultraviolett
X _a , X _i	a = extrazellulär (<u>a</u> ussen), i = intrazellulär (<u>i</u> nnen)
WT	Wildtyp
(w/v)	„weight per volume“
yeGFP	„yeast enhanced“ GFP
z. B.	zum Beispiel
[X]	Konzentration von X

Innerhalb der Sequenzen wurden Nukleotide durch den Anfangsbuchstaben der Basen dargestellt. Die Abkürzungen der Aminosäuren im Einbuchstaben- und Dreibuchstabencode erfolgten nach der IUPAC-Nomenklatur.

Weiterhin wurden die üblichen Abkürzungen der Basis- sowie der abgeleiteten Einheiten des „Système Internationale“ mit den Kurzzeichen zur Bezeichnung von Vielfachen und Bruchteilen verwendet.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Kaliumkanäle.....	1
1.1.1 Funktion und Struktur von Kaliumkanälen	1
1.1.2 Krankheiten, die auf Fehlfunktionen in K ⁺ -Kanälen beruhen.....	3
1.2 Systeme für die (pharma-/toxikologische) Untersuchung von Kaliumkanälen.....	6
1.2.1 Funktionsbasierte Verfahren mit tierischen Zellen	6
1.2.2 Funktionsbasierte Verfahren mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellsystem	6
1.3 Endogene Kalium-Translokationssysteme in <i>S. cerevisiae</i>	8
1.4 Die K ⁺ -Kanäle hERG und mKir2.1	10
1.4.1 Der humane Kaliumkanal hERG	10
1.4.2 Der Kaliumkanal Kir2.1	13
1.5 Trafficking von heterolog exprimierten Plasmamembranproteinen	16
1.6 Ziele der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Organismen.....	19
2.1.1 <i>S. cerevisiae</i> Stämme	19
2.1.2 <i>Escherichia coli</i>	22
2.2 Chemikalien und Medien.....	22
2.3 Verwendete Plasmide	27
2.4 Verwendete Oligonukleotide	28
2.5 Anzucht von Bakterienzellen	28
2.5.1 Bakterienflüssigkulturen.....	28
2.5.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	29
2.5.3 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	29
2.5.4 Bestimmung der Transformationseffizienz und der Reinheit kompetenter Bakterienzellen	30
2.6 Anzucht von Hefen.....	30
2.6.1 Hefevorkultur (flüssig)	30
2.6.2 Hefevorkultur (fest)	30
2.6.3 Glycerinkultur	30
2.6.4 Herstellung kompetenter Hefezellen nach der Lithiumacetat-Methode.....	31
2.6.5 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> Stämmen	31
2.6.5.1 Transformation mit einem sich episomal replizierenden Plasmid	32
2.6.5.2 Transformation zur chromosomalen Expression in den Leu2- oder Tok1-Locus von <i>S. cerevisiae</i>	32
2.6.5.3 Transformation von Hefezellen.....	33
2.6.6 „Plasmid Loss“ zum Entfernen von Plasmiden aus Hefen	33
2.6.7 Bestimmung der Populationsgröße.....	33
2.6.8 Herstellung von Protoplasten.....	34
2.6.9 Replika-Plattierung von Hefezellen	35
2.7 Präparation von Nukleinsäuren	35
2.7.1 Präparation genomischer DNA aus Hefen /Hefe-Plasmid-Präparation	35
2.7.2 Plasmid Recovery	36
2.7.3 Plasmid-Minipräparation aus Bakterien durch alkalische Lyse	36

2.7.4	Präparation reiner Plasmid-DNA aus Bakterien	36
2.7.5	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA.....	37
2.7.6	Ethanol-Fällung von DNA	37
2.7.7	Restriktionsspaltung von DNA	37
2.7.8	Ligation von DNA	38
2.7.9	DNA-Gelelektrophorese.....	38
2.7.10	DNA-Elution aus Agarosegelen	39
2.7.11	Quantifizierung von DNA durch Messung der optischen Dichte.....	39
2.7.12	Sequenzierung von DNA	39
2.7.13	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	40
2.8	Biochemische Methoden	41
2.8.1	Proteinaufreinigung.....	41
2.8.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	42
2.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
2.8.4	Anfärbung der Proteine im Gel.....	42
2.8.5	Western-Blot	43
2.8.6	Ponceau-Färbung	43
2.8.7	Immunfärbung.....	43
2.9	Wachstumstests	44
2.9.1	Vorkulturen für Wachstumstests	44
2.9.2	Durchführung des Wachstumstests in Mikrotiterplatten	44
2.9.3	Auswertung von Wachstumstests	45
2.10	Mikroskopie	46
2.11	Anfärbung von Bestandteilen der Plasmamembran	47
2.11.1	Anfärbung von Ergosterol mit Filipin (Sigma F-9765)	47
2.11.2	Anfärbung von GM1-Gangliosiden mit Vybrant® Alexa Fluor® 594 Lipid Rafts Labeling Kit.....	47
2.11.3	Anfärbung mit FM 4-64	48
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Untersuchungen zur funktionellen Expression des humanen ERG-Kanals in K ⁺ -Aufnahme-Mutanten von <i>S. cerevisiae</i>	49
3.1.1	Lokalisation von hERG	49
3.1.2	Untersuchung zu einem hERG-spezifischen Wachstumsphänotyp	51
3.2	Untersuchungen zur funktionellen Expression des murinen Kir2.1-Kanals in <i>S. cerevisiae</i> K ⁺ -Aufnahme-Mutanten.....	52
3.2.1	Lokalisation von mKir2.1	52
3.2.1.1	Kann mKir2.1 in „Lipid-Flößen“ (Lipid Rafts) lokalisiert werden?	54
3.2.1.1.1	Anfärbung von Lipid-Rafts.....	54
3.2.1.1.2	Modulatoren von Lipid Rafts	57
3.2.2	Die Expression von <i>mKir2.1</i> in der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante verringert die Empfindlichkeit gegenüber Hygromycin B unter nicht-permissiven K ⁺ -Konzentrationen.....	58
3.2.3	mKir2.1 spezifischer Wachstumsphänotyp	59
3.2.4	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zur Lokalisation von GFP-mKir2.1 in der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante in Abhängigkeit vom extrazellulären pH. 61	
3.2.5	Spezifische Inhibierung von mKir2.1 vermitteltem Wachstum	61

3.2.6 mKir2.1 spezifischer Phänotyp bei 100 mM KCl	68
3.2.6.1 Effekt von CsCl auf den mKir2.1-spezifischen Wachstumsphänotyp bei 100 mM KCl in gepuffertem Medium	69
3.2.6.2 Ist ein erhöhter ATP-Verbrauch durch das K ⁺ -Efflux-System Ena1 Ursache für die Wachstumsinhibierung bei 100 mM KCl bei Expression von <i>mKir2.1</i> ?	70
3.2.6.2 Applikation von Hygromycin B in ungepufferten und gepufferten Medien.....	71
3.2.7 Expression von <i>mKir2.1</i> in <i>S. cerevisiae</i> -Stämmen mit defektem K ⁺ -Export- System.....	73
4 Diskussion	76
4.1 Expression von <i>HERG</i> in <i>S. cerevisiae</i> K ⁺ -Aufnahme-Mutanten.....	77
4.1.2 Fehlende Komplementation des Wachstums von K ⁺ -Aufnahme-Mutanten	77
4.1.1 Lokalisation von hERG in der Plasmamembran.....	79
4.2 Funktionelle Expression von <i>mKir2.1</i> in <i>S. cerevisiae</i> K ⁺ -Aufnahme-Mutanten..	82
4.2.1 Untersuchungen bei limitierenden K ⁺ -Konzentrationen.....	82
4.2.2 Grenzen des Testsystems	84
4.2.3 Untersuchungen bei hohen KCl-Konzentrationen.....	87
4.2.4 Pharma-/Toxikologie bei hohen K ⁺ -Konzentrationen	90
4.2.4 Lokalisation von mKir2.1 in <i>S. cerevisiae</i>	92
5 Zusammenfassung.....	96
6 Literaturverzeichnis	98
7 Anhang.....	113
7.1 Konstruktion der Plasmide	113
7.1.1 Konstruktion von pYEx-GFP-HERG.....	113
7.1.2 Konstruktion von pYEx-GFP-HERG _{LGL}	114
7.1.3 Konstruktion von pYEx-GFP-HERG _{LGL_FCYLENE}	115
7.2 Standardarbeitsanweisung (SOP) für Substanztests	116

1 Einleitung

1.1 Kaliumkanäle

1.1.1 Funktion und Struktur von Kaliumkanälen

Kalium ist das häufigste Kation in lebenden Zellen und stellt hier das Hauptgegenion für den Überschuss an negativer Ladung von Proteinen und Nukleinsäuren. Da Phospholipiddoppelschichten für Ionen nahezu undurchlässig sind, findet ein Transport von K^+ über die Plasmamembran über aktive und passive Transportmechanismen statt. Die Anreicherung von Kaliumionen im Zellinneren gegen hohe Konzentrationsgradienten erfolgt über aktive Transportprozesse wie z.B. über die Na^+/K^+ -ATPase in tierischen Zellen. Kaliumkanäle transportieren passiv mit hoher Selektivität Kalium-Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten durch biologische Membranen. Kaliumkanäle sind an vielen essentiellen physiologischen Prozessen, wie Stabilisierung des zellulären Ruhepotentials, neuronale Erregbarkeit, Muskelkontraktion und Sekretion von Salzen, Neurotransmittern und Hormonen beteiligt (Bichet *et al.*, 2003). Eine der wesentlichen Funktionen ist die Membranrepolarisierung nach Aktionspotentialen, wodurch Frequenz und Form der Reizweiterleitung signifikant beeinflusst werden.

Unter strukturellen wie auch funktionellen Aspekten heben sich Kaliumkanäle unter den Ionenkanälen durch die bei weitem größte Diversität ab. Die Einteilung der „Superfamilie“ der K^+ -Kanäle in Klassen und Familien erfolgt entlang der postulierten Topologie und dem Steuerungsmechanismus. K^+ -Kanäle sind homo- oder heteromere Proteine aus porenbildenden α -Untereinheiten und es können β -Untereinheiten assoziiert sein. α -Untereinheiten von K^+ -Kanälen können zwei, vier, sechs oder acht Transmembranhelices (TM) aufweisen (Abb. 1.1). Ein allen K^+ -Kanal- α -Untereinheiten zugrundeliegendes topologisches Merkmal ist eine kurze Schleife (P-Schleife oder Porendomäne), jeweils flankiert von zwei Transmembranhelices (2TM/P-Motiv). Jeweils vier dieser 2TM/P-Motive werden benötigt, um eine Kanalpore zu bilden (zur Übersicht siehe Abb. 1.1). β -Untereinheiten können zytoplasmatische oder membrangebundene Proteine sein. Sie tragen nicht zur Struktur der Kanalpore bei und können modulierende, stabilisierende oder Chaperon-ähnliche Funktionen haben (Nagaya & Papazian, 1997).

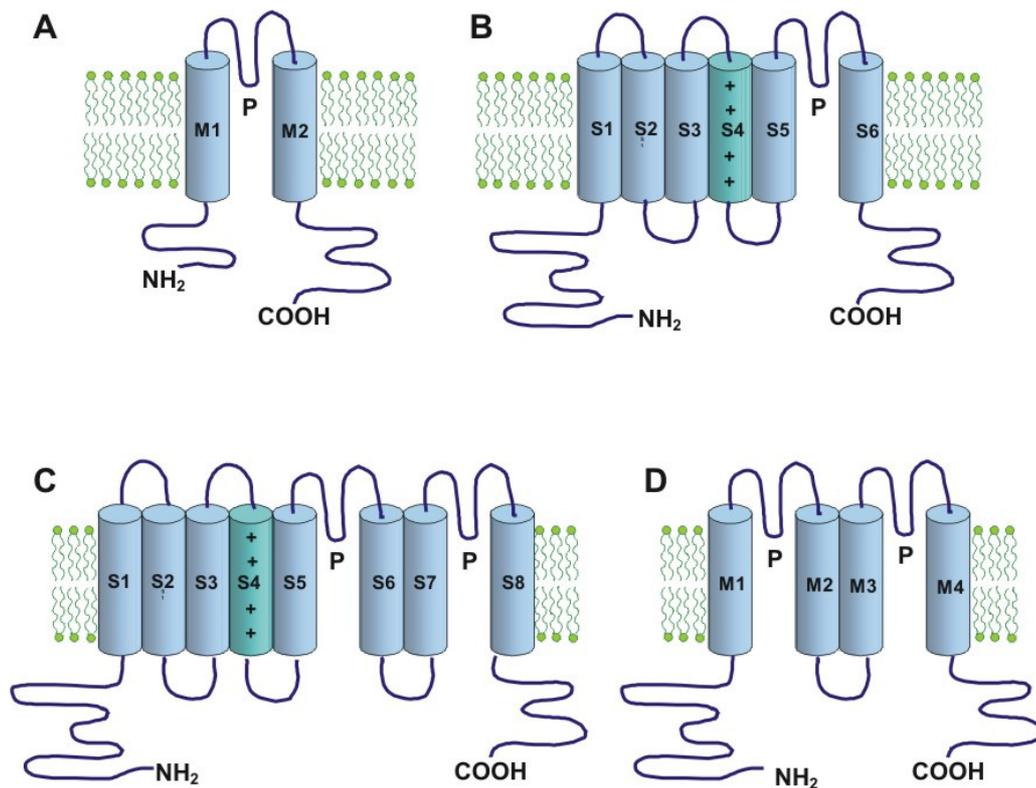


Abb. 1.1: Die vier Hauptklassen von K⁺-Kanälen (nach Choe, 2002). **A:** Untereinheiten von 2TM/P-Kanälen bestehend aus 2 Transmembranhelices (TM) und einer Porenschleife (P) wie z.B. bei einwärtsgerichteten Kir-Kanälen. **B:** 6TM/P-Kanäle: Die meisten spannungs- oder ligandengesteuerten K⁺-Kanäle inklusive hERG als spannungsgesteuertem K⁺-Kanal haben eine derartige Topologie. **C:** 8TM/2P-Kanäle, welche wahrscheinlich Hybride aus 6TM/P- und 2TM/P-Kanälen sind. Der auswärtsgerichtete K⁺-Kanal Tok1p aus *S. cerevisiae* ist derartig aufgebaut. **D:** 4TM/2P-Kanäle, die aus zwei Wiederholungen des 2TM/P-Musters bestehen. Bei 2TM/P- und 6TM/P-Kanälen bilden 4 Untereinheiten einen Kanal und bei 8TM/2P- und 4TM/2P-Kanälen bilden wahrscheinlich 2 Untereinheiten einen Kanal, so dass jeder vollständige Kanal jeweils vier Wiederholungen des Musters 2TM/P aufweist.

Die maximale Transportrate für K⁺ ist mit bis zu 10⁸ Ionen pro Sekunde (Morais-Cabral *et al.*, 2001) deutlich höher als die von K⁺-Transportern. Da wenige aktive K⁺-Kanäle ausreichen würden, das elektrochemische Potential von K⁺ über der Plasmamembran zu nivellieren, bedarf es der Regulierung der Kanalöffnung (Gating) (Choe, 2002). Das Öffnen von K⁺-Kanälen kann durch viele unterschiedliche Faktoren reguliert werden, wie Änderung des Membranpotentials, Änderung der intrazellulären Konzentration bestimmter Ionen (z.B. Ca²⁺) oder kleiner organischer Moleküle (ATP, cAMP, Phosphatidylinositolphosphat) sowie auch durch Proteine (G-Proteine) (Roosild *et al.*, 2004). Man spricht bei dem Übergang vom geschlossenen in den offenen und damit für K⁺-Ionen leitfähigen (aktiven) Zustand von „Aktivierung“

(des Kanals) und bei der Rückkehr in den geschlossenen Zustand von „Deaktivierung“ (zur Übersicht siehe Armstrong & Hille, 1998). Darüber hinaus gehen viele K^+ -Kanäle nach einer andauernden (chemischen oder elektrischen) Aktivierung in einen geschlossenen „inaktiven“ Zustand über (Inaktivierung). Ähnlich zum geschlossenen, deaktivierten Zustand ist hier der Stromfluss unterbrochen. Allerdings ist der Kanal weiteren Reizen gegenüber unempfindlich und kann aus dem inaktiven Zustand nur in den deaktivierten Zustand übergehen (Alberts, 2004). Ein postulierter Mechanismus der Ionenkanal-Inaktivierung spannungsgesteuerter K^+ -Kanäle ist das Ball-und-Kette Modell nach Bezanilla & Armstrong (1977) (Abb. 1.2).

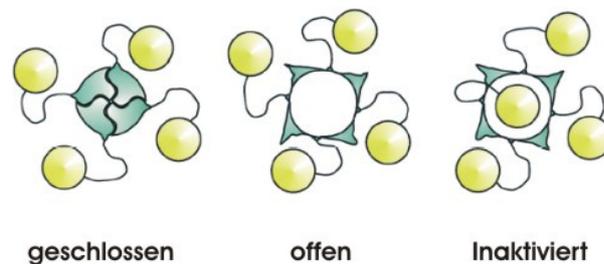


Abb. 1.2: Ball-und-Kette Modell für die Kanalaktivierung (nach Bezanilla & Armstrong, 1977): Die Inaktivierungsdomäne (oder „Ball“) ist mit einer flexiblen (Peptid-) „Kette“ verbunden. In geschlossenen Zustand ist der Ball im Cytosol lokalisiert. Nach Reizung (Depolarisation) öffnet der Kanal und erzeugt eine negativ geladene Bindungsstelle für den positiv geladenen Ball in der Nähe der Porenöffnung. Die Anlagerung des Balls an diese Bindungsstelle verschließt die Porenöffnung und inaktiviert den Kanal.

1.1.2 Krankheiten, die auf Fehlfunktionen in K^+ -Kanälen beruhen

Aufgrund der vielseitigen Funktionen von K^+ -Kanälen liegt es nahe, dass angeborene oder erworbene Fehlfunktionen in diesen Kanälen eine Vielzahl von Krankheitsbildern hervorrufen können. Krankheiten, die durch Fehlfunktionen z.B. durch Mutationen in Ionenkanalgenen ausgelöst werden, fasst man etwa seit Mitte der 90er Jahre unter dem Oberbegriff „channelopathy“ zusammen.

Fehlfunktionen in Kaliumkanälen können nach Bichet *et al.* (2003) zu Störungen im Herzmuskel und Gefäßsystem (z.B. vom Ventrikel ausgehende Pulsbeschleunigung [ventrikuläre Tachykardie] oder Bluthochdruck), im inneren Ohr (Taubheit), im

Muskelgewebe (z.B. Muskelzuckungen [Myokymie]), im Gehirn (z.B. Epilepsie) und im Pankreas (niedriger Blutzuckerwert aufgrund gesteigerter Insulinsekretion [hyperinsulinämische Hypoglykämie]) auftreten. Darüber hinaus können derartige Fehlfunktionen auch zu Entwicklungsanomalien (Andersen Syndrom) führen (Bichet *et al.*, 2003). Dabei lassen sich zugrunde liegende Ursachen der Fehlfunktionen sowohl bei α - als auch bei β -Untereinheiten (Splawski *et al.*, 1997, Abbot *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2003) finden. Kaliumkanäle sind somit sehr attraktive Ziele für potentielle pharmakologische Interventionen. Die Suche nach potenten und spezifischen K^+ -Kanal-Modulatoren erstreckt sich einerseits auf Substanzen, welche die normale Funktion der Kanäle beeinträchtigen (z.B. einige Medikamente, siehe unten.) und solche, die mutationsbedingte Fehlfunktionen aufheben können.

Viel Aufmerksamkeit haben im Zusammenhang mit Fehlfunktionen in Kaliumkanälen die sog. Long QT-Syndrome (LQTS) erregt (Haverkamp *et al.* 2001). LQT-Syndrome sind durch eine im Oberflächen-Elektrokardiogramm (EKG) nachweisbare abnorme Verlängerung der QT-Intervall-Dauer (Abb. 1.5 C, Seite 11) und das spontane Auftreten von unkoordinierter Herzmuskeltätigkeit mit hoher Pulsfrequenz und wellen- bzw. schraubenförmigen Muster im EKG (Torsade de Pointes (TdP)) (Abb. 1.5 D, Seite 11) charakterisiert. Von 8 beschriebenen Arten des LQT-syndroms (LQT1-8) werden fünf mit Fehlfunktionen in Kaliumkanälen in Verbindung gesetzt (Haverkamp *et al.*, 2001, Tristani-Firouzi *et al.*, 2002, Zitron *et al.*, 2005). Diese Herz-Rhythmusstörungen führen zu einer starken Reduktion der Pumpleistung des Herzens und zu einem konsekutiven Abfall des (üblicherweise am Patienten gemessenen) systemischen Blutdrucks (Zitron *et al.*, 2005); sie können zu Ohnmachtsanfällen und, bei Übergang der TdP zu Kammernflimmern, zu plötzlichen Herztod führen. Neben Formen von erblichen LQT-Syndromen (Romano-Ward-Syndrom und Jervell-und-Lange-Nielson-Syndrom) kommen auch Formen einer erworbenen, mit TdPs einhergehenden, Verlängerung des QT-Intervalls vor (Haverkamp *et al.*, 2001). In den letzten Jahren gewann insbesondere die Untersuchung von pharmakologisch bedingten QT-Verlängerungen mit TdP an Bedeutung. Zahlreiche Medikamentenklassen sind betroffen wie z.B. Antiarrhythmika, Antipsychotika, manche Antibiotika, Antihistaminika, Malariamittel und Virustatika. Während bei den Antiarrhythmika TdPs relativ häufig als Nebenwirkung auftreten (Quinidine: 2-9% der behandelten Patienten), kommen sie bei nicht antiarrhythmischen Arzneien relativ selten vor (z.B. Cispride: 1 von 120000 Patienten;

Sanguinetti & Tristani Firouzi, 2006). Für Arzneimittel-induzierte Verlängerungen des QT-Intervalls und TdPs werden in den meisten Fällen die direkte Bindung an α -Untereinheiten humaner ERG-K⁺-Kanäle (hERG-Kanäle, siehe 1.4.1) oder eine indirekte Einflussnahme auf die Kanalaktivität von hERG verantwortlich gemacht (Sanguinetti & Tristani Firouzi, 2006). Als Reaktion auf die mit der Einnahme verbundenen Risiken, wurden einige dieser Substanzen vom Markt genommen oder nur zu eingeschränkter Anwendung freigegeben, wie z.B. Cisapride, Sertindole, Grepafoxacin, Terfenadin und Astemizole (Sanguinetti & Tristani Firouzi, 2006).

Weiterhin wurden neue internationale Richtlinien für die Medikamentenentwicklung in Hinblick auf die Evaluierung potentieller arzneimittelbedingter kardialer Risiken insbesondere durch Modulatoren der an der Repolarisation der Herzmuskelzellen beteiligten K⁺-Kanäle hERG und KvLQT1 erstellt. Die ICH-Richtlinien (ICH, *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) S7A und S7B dienen hierbei als Bewertungsgrundlage für die präklinische Phase der Medikamentenentwicklung, die Richtlinie ICH E14 für die 1. klinische Phase.

Bislang wurden in der präklinischen Phase der Medikamentenentwicklung eine vielfältige Reihe von biochemisch-pharmakologischen Versuchen insbesondere im Hinblick auf Geno- und Zytotoxizität durchgeführt. Mit neuen *in vitro*- und *in vivo*-Modellsystemen (z.B. Säuger-Zelllinien oder Hefen) könnte nun auch die Potenz von Arzneimitteln, die Repolarisation in Herzmuskelzellen oder die normale Funktion von kardialen K⁺-Kanälen zu modulieren, untersucht werden. Auch wenn bei der Medikamentenentwicklung letzten Endes zeitaufwendige, kostenintensive und ethisch nicht unbedenkliche Tierversuche unabdingbar sind, könnte durch automatisierte Screening-Prozesse in solchen Modellsystemen die Beurteilung der Verträglichkeit von Wirkstoffen beschleunigt und die Anzahl der Tierversuche somit eingeschränkt werden.

1.2 Systeme für die (pharma-/toxikologische) Untersuchung von Kaliumkanälen

1.2.1 Funktionsbasierte Verfahren mit tierischen Zellen

Elektrophysiologische Techniken wie Voltage- und Patch Clamp sind die einzigen Techniken mit ausreichend hoher zeitlicher Auflösung und Sensitivität, um Eigenschaften von K⁺-Kanälen direkt und präzise zu charakterisieren. Humane Kaliumkanäle wurden unter Anwendung elektrophysiologischer Methoden in geeigneten Modellsystemen wie z.B. HEK293-Zellen (Smith *et al.*, 1996) oder *Xenopus* Oozyten (Sanguinetti *et al.*, 1995) untersucht. Allerdings ist diese Technik sehr geräte- und zeitaufwendig. Die Anzahl der Substanzen, die auf potentielle Effekte auf die Funktion von K⁺-Kanälen hin untersucht werden müssten, beläuft sich allerdings auf Zahlen weit oberhalb von 100.000. Derartige Mengen lassen sich effizient nur noch mit Methoden eines Hochdurchsatzscreenings (*High Throughput Screening*, HTS) untersuchen. Um diesen Anforderungen bei der Untersuchung von Kaliumkanälen annähernd gerecht zu werden, wurde eine Reihe von neuen Techniken entwickelt, wie z.B. ein Rubidium-Efflux-Assay in CHO- bzw. HEK293-Zellen (Cheng *et al.*, 2002; Rezazadeh *et al.*, 2004), Assays mit weitgehend automatisierter elektrophysiologischer Methodik in CHO- und HEK 293-Zellen (z.B. Gou & Guthrie, 2005; Guthrie *et al.*, 2005) Radioligand-Binde-Assays (Chiu *et al.*, 2004; Raab *et al.*, 2006) und ein Assay mit Membranpotential-sensitiven Farbstoffen in CHO-Zellen (Slack *et al.*, 2006).

1.2.2 Funktionsbasierte Verfahren mit *Saccharomyces cerevisiae* als Modellsystem

Die Hefe *S. cerevisiae* hat sich als Modellsystem zum Verständnis zellulärer Vorgänge bewährt. Von der Hefe bis hin zum Menschen finden sich starke Übereinstimmungen im zellulären Aufbau und in physiologischen Prozessen. Viele humane Gene, die mit menschlichen Krankheiten verbunden sind, haben ihre Orthologe in Hefe. (Ploger *et al.*, 2000). Schon 1996 wurde das *S. cerevisiae* Genom als erstes eukaryotisches Genom vollständig sequenziert (Goffeau *et al.*, 1996), woraufhin die Hefe zu einem Schlüsselorganismus in der Genomforschung wurde (Scherman, 2002). Für die

Expression heterologer Proteine verbindet *S. cerevisiae* die Vorteile eines prokaryotischen Expressionssystems wie einfache Handhabung und schnelles Wachstum mit denen eines eukaryotischen Organismus.

Auch wenn *S. cerevisiae* prinzipiell einer elektrophysiologischen Analyse von Membrankomponenten zugänglich ist (Bertl *et al.*, 1998) sind bisher keine Ergebnisse solcher Untersuchungen an heterolog exprimierten Säuger-K⁺-Kanälen veröffentlicht worden. Lediglich zu K⁺-Kanälen aus Pflanzen konnte eine elektrophysiologische Charakterisierung in *S. cerevisiae* gezeigt werden (Bertl *et al.*, 1995; Becker *et al.*, 2005).

Funktionelle Untersuchungen von heterolog exprimierten Kaliumkanälen basierten daher in *S. cerevisiae* weitgehend auf der Komplementation von K⁺-Aufnahme defekten Mutanten (*S. cerevisiae* $\Delta trk1,2$) und Untersuchungen zur K⁺ bzw Rb⁺ Aufnahme. Bisherige Arbeiten berichteten über die funktionelle Expression von einwärts gleichrichtenden Kaliumkanälen aus Pflanzen (Schachtmann *et al.*, 1992; Sentenac *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 1994) und Säugern (Tang *et al.*, 1995; Bichet *et al.*, 2004; Zaks-Makhina *et al.*, 2004) in *S. cerevisiae* $\Delta trk1,2$ Doppelmutanten. Der Wachstumsdefekt der $\Delta trk1,2$ Mutanten auf K⁺-limitierten Medien wird von der Unfähigkeit, bei niedrigem pH zu wachsen (Bertl *et al.*, 2003) sowie von einer starken Hyperpolarisation der Plasmamembran (Madrid *et al.*, 1998; Maresova *et al.*, 2006)) begleitet. Die funktionelle Expression von durch Hyperpolarisation aktivierten K⁺-Kanälen kann daher zur Restaurierung des Wildtyp-Wachstumsphänotyps führen. Darauf basierend haben Zaks-Makhina *et al.* (2004) ein für ein Hochdurchsatz-Screening weitgehend taugliches Testsystem zur Detektion von Modulatoren des K⁺-Kanals Kir2.1 entwickelt. Eine analoge Expression des humanen ERG-K⁺-Kanals (hERG) im *S. cerevisiae*-Modell wurde bislang noch nicht beschrieben.

K⁺-Kanäle als Plasmamembranproteine bedingen zur erfolgreichen funktionellen Expression die Insertion in die Plasmamembran. Obwohl die Hefe viele posttranslationale Prozesse wie Disulfid-Brücken-Bildung, Signalpeptid-Erkennung bzw. Abspaltung, N- und O-Glykosylierung durchführen kann, kann die Zielsteuerung heterolog exprimierter Plasmamembranproteinen vollständig oder zumindest teilweise fehlschlagen. Kasahara & Kasahara (1997) und Kiser *et al.* (2001) dokumentieren eine fehlende Plasmamembranlokalisation bei heterologer Expression der Säuger-Plasmamembran-Proteine Glut4 und CFTR und deren

wahrscheinliche Akkumulation im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Prinz *et al.*, (2003) beschreiben zwar eine funktionelle Expression von humanem Transferrin-Rezeptor in *S. cerevisiae*, aber für den überwiegenden Teil dieses Plasmamembranproteins eine offensichtliche Retention in ER und/oder Golgi-Apparat.

1.3 Endogene Kalium-Translokationssysteme in *S. cerevisiae*

Die Untersuchung von heterolog exprimierten Kaliumkanälen in *S. cerevisiae* bedingt i.d.R. eine Disruption von wesentlichen endogenen K^+ -Translokationssystemen. Die in der Plasmamembran lokalisierten hoch affinen und strukturell verwandten K^+ -Transporter Trk1p und Trk2p stellen in *S. cerevisiae* Zellen die wesentlichen Komponenten für den Einwärtstransport von K^+ -Ionen dar (Ramos *et al.*, 1985, Gaber *et al.*, 1988; Ko & Gaber, 1991). Trk2 ist im Gegensatz zu Trk1 nur schwach exprimiert (Ko *et al.*, 1990, Ramos *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 1995).

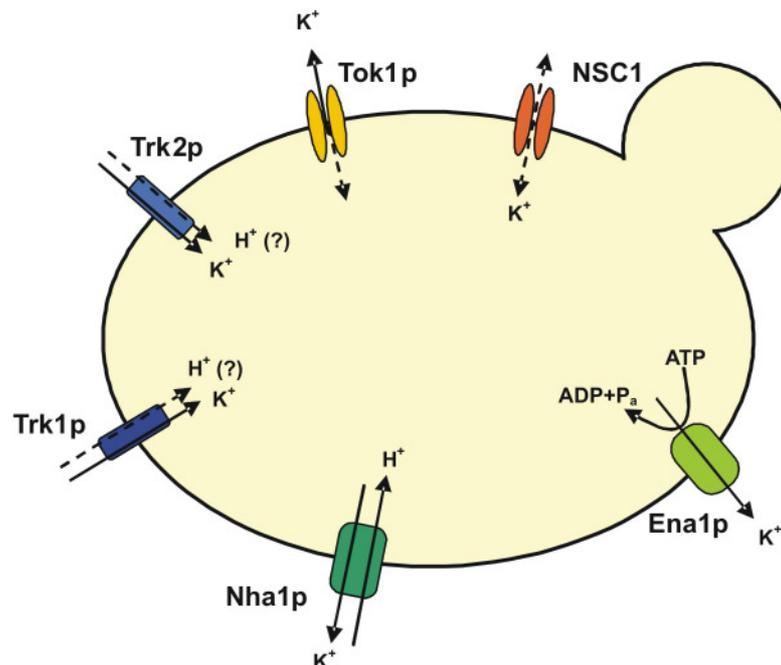


Abb. 1.3: Übersicht zu Transportsystemen in *S. cerevisiae*, die im K^+ -Transport involviert sind: Trk1p und Trk2p: Kaliumaufnahme-systeme, Tok1p: Auswärtsgleichrichter- K^+ -Kanal, NSC1: unspezifischer putativer Kationenkanal. Nha1p und Ena1p: K^+ -Effluxsysteme.

Darüber hinaus exprimieren *S. cerevisiae* Zellen einen Vertreter der K⁺-Kanal-Superfamilie: Tok1p ist ein zweiporiger, spannungsabhängiger Auswärtsgleichrichter (Ketchum *et al.*, 1995), der unter bestimmten Bedingungen auch eine Kaliumaufnahme vermitteln kann (Fairman *et al.*, 1999). In *S. cerevisiae* existiert mindestens noch ein weiteres Protein, welches mit niedriger Affinität einen K⁺-Einstrom in die Zelle bewirken kann. Hierbei handelt es sich um den nicht-selektiven-Kationenkanal NSC1, der bisher nur aufgrund elektrophysiologischer Untersuchungen in *Δtrk1,2*-Mutanten beschrieben wurde (Bihler *et al.*, 1998, Bihler *et al.*, 2002) und dessen Gen bislang nicht identifiziert werden konnte. NSC1 vermittelte Ionenströme können durch Anhebung des extrazellulären [Ca²⁺] auf 10 mM und durch Absenkung des pH auf 4 unterdrückt werden (Bihler *et al.*, 1998, Bihler *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde eine potentielle unspezifische K⁺-Aufnahme durch eine Reihe unterschiedlicher und nicht verwandter Transporter (Aminosäuren-, Zucker-, Inositol- und Cholin-Transporter) vorgeschlagen (Madrid *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 2004). Neben Translokationssystemen zur K⁺-Aufnahme spielen in *S. cerevisiae* auch K⁺-Efflux-Systeme bei der Regulation des intrazellulären Kaliumgehalts eine wichtige Rolle. Ein Überschuss an intrazellulärem Kalium kann durch zwei in jeweils unterschiedlichen pH-Bereichen aktiven Efflux-Systemen, Ena1 und Nha1 eliminiert werden (Banuelos *et al.*, 1998). Ramirez *et al.* (1998) schlugen als weiteres K⁺-Exportsystem in der Plasmamembran den K⁺/H⁺-Antiporter (Kha1p) vor. Diese Hypothese konnte jedoch durch Untersuchungen von Maresova & Sychova (2005) widerlegt werden. Ein Gleichgewicht zwischen Influx und Efflux von K⁺ über die Plasmamembran spielt eine wichtige Rolle bei der K⁺-Homöostase, der Aufrechterhaltung des intrazellulären pH und der Regulierung des Zellvolumens (Sychova, 2004). Das Optimum für den intrazellulären K⁺-Gehalt liegt bei etwa 200-300 mM (Rodriguez-Navarro, 2000).

1.4 Die K⁺-Kanäle hERG und mKir2.1

Die K⁺-Kanäle hERG und mKir2.1 als Gegenstand dieser Dissertation werden nun im Folgenden beschrieben.

1.4.1 Der humane Kaliumkanal hERG

Durch Homologie-Screening von cDNA-Sequenzen konnte der K⁺-Kanal hERG (human *ether-à-go-go*-related gene) der EAG-Familie der spannungsabhängigen K⁺-Kanäle zugeordnet werden. *HERG* kodiert ein Protein aus 1159 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 127 kD (Warmke & Ganetzky, 1994). Es wird angenommen, dass bei allen Mitgliedern der EAG-K⁺-Kanal Familie ein funktioneller Kanal aus vier Untereinheiten aufgebaut ist, wobei jede dieser Untereinheiten 6 Transmembrandomänen mit jeweils der S4 Transmembrandomäne als Spannungssensor aufweist (Bauer & Schwarz, 2001, Abb. 1.1 B). Diese S4-Domäne hat eine hohe Dichte an positiv geladenen Aminosäureresten, die bei Depolarisation der Membran zu einer reversiblen Lageveränderung der S4-Domäne in der Membran führen soll. Aufgrund dieser Bewegung öffnet sich der Kanal und wird dadurch aktiviert (Jiang *et al.*, 2003).

In Säugern zeichnet sich die für die EAG-K⁺-Kanal-Familie namensgebende Gruppe der EAG-Kanäle durch eine langsame Aktivierung und fehlende Fähigkeit zur Inaktivierung bei fortgesetzter Depolarisation aus (Bauer & Schwarz, 2001). Somit vermitteln EAG-Kanäle bei depolarisierter Membran größere Auswärtsströme.

Bei hERG-Kanälen findet ebenfalls eine Aktivierung bei depolarisierter Membran statt. Bei Depolarisation zu Potentialen unter 0 mV findet ein langsamer Anstieg der Leitfähigkeit statt, ein Gleichgewichtszustand wird hierbei erst nach mehreren Sekunden erreicht (Sanguinetti *et al.*, 1995, Snyders & Chaudhary, 1996).

Spezifisch für hERG ist, dass eine Depolarisation zu positiven Membranpotentialen nur zu schwachen Auswärtsströmen führt, während bei der anschließenden Repolarisation kurzfristig starke Ströme auftreten. Dieses Phänomen wird wie folgt erklärt: Die Inaktivierung des Kanals ist schneller als die Aktivierung und die Erholung von der Inaktivierung bei Membranrepolarisation ist schneller als die Deaktivierung. (Sanguinetti *et al.*, 1995, Trudeau *et al.*, 1995, Smith *et al.*, 1996, Abb. 1.4). Dies bedingt, dass in Säugern ERG-Kanäle wie Einwärtsgleichrichter funktionieren, während EAG-Kanäle im Wesentlichen die Funktion von

Auswärtsgleichrichtern haben, obwohl beide ähnliche strukturelle und z.T. ähnliche biophysikalische Eigenschaften aufweisen. Wegen der verzögerten Leitfähigkeit nach Membrandepolarisation werden ERG-Kanäle auch als verzögerte Gleichrichter (*delayed rectifier*) bezeichnet.

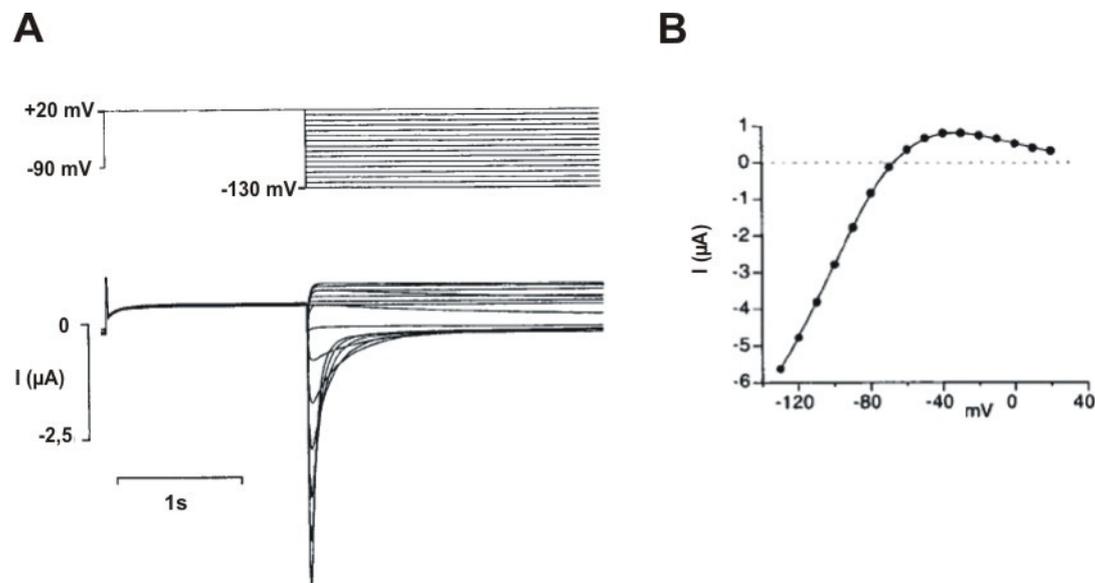


Abb 1.4. Beispiel für eine elektrophysiologische Untersuchung des Strom-Spannungs-Verhältnis von hERG (nach Spector *et al.*, 1996) **A:** Ausgehend von einem Ruhepotential von -90 mV wurde nach einem 1,6 sek langen Vorpuls Testpulse (in 10 mV-Schritten) mit Potentialen von -130 bis +20 mV angelegt. **B:** Strom-Spannungsdiagramm zu Ergebnissen von A. Aufgetragen sind die maximalen Ströme I gegen die angelegte Testspannung.

Der Kaliumkanal hERG wird im Menschen in vielen Geweben und Zelltypen exprimiert. Zu den Zelltypen gehören Nerven-, glatte Muskel- und Tumorzellen. Die stärkste Expression von *HERG* wurde im Herzen gefunden (Sanguinetti & Tristani Firouzi, 2006). HERG Kaliumkanäle sind für die normale elektrische Aktivität im Herzen essentiell. Sie tragen hier als schnelle Komponente des verzögerten Gleichrichter Stroms (I_{Kr} , I (Symbol für Strom), K^+ , *rapid*) wesentlich zur Repolarisation des ventrikulären Aktionspotentials bei (Sanguinetti & Jurkiewicz 1990; Sanguinetti *et al.*, 1995) (Abb. 1.5 A und B). Die Bedeutung von hERG- K^+ -Kanälen wurde offensichtlich, nachdem Mutationen im *HERG*-Gen (*KCNH2*) als eine Ursache für das LQT2-Syndrom (zu LQT-Syndromen siehe 1.1.2 und Abb. 1.5 C und D) erkannt wurden (Curran *et al.*, 1995).

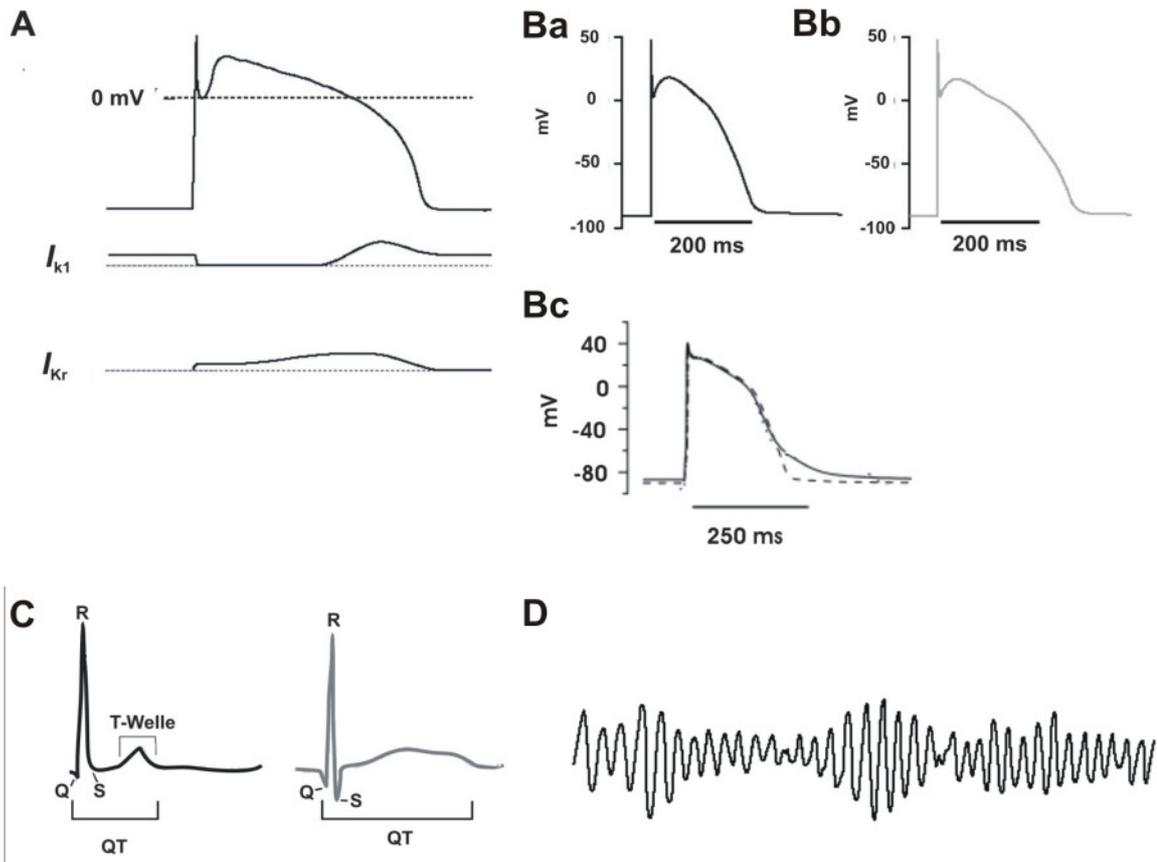


Abb. 1.5: Einfluss repolarisierender K^+ -Ströme durch die K^+ -Kanäle hERG und Kir2.1 auf das kardiale Aktionspotential. **A:** Vergleich des zeitlichen Ablaufs des kardialen Aktionspotentials mit den auswärts gerichteten repolarisierend wirkenden K^+ -Strömen I_{K1} und I_{Kr} (die weiteren am kardialen Aktionspotential beteiligten Ionenströme sind hier nicht aufgeführt). I_{K1} wird mit Kir2.1 und I_{Kr} mit hERG in Verbindung gesetzt (modifiziert nach Haferkamp *et al.*, 2000). **B:** Einfluss einer verringerten Aktivität von hERG bzw. Kir2.1 auf das kardiale Aktionspotential nach Sanguinetti & Tristani-Firouzi (2006) und Tristani-Firouzi *et al.* (2002): Verglichen mit dem Wildtyp (Ba oder Bc gestrichelte Linie) führt eine Reduzierung der Ströme durch hERG (Bb) bzw. durch Kir2.1 (Bc durchgehende Linie) jeweils zu einer Verzögerung der Repolarisation. **C:** Beispiel für die Auswirkung einer verzögerten Repolarisation des kardialen Myokards auf das Elektrokardiogramm (EKG): Die QRS-Gruppe im EKG spiegelt die Erregungsausbreitung, die T-Welle die Repolarisation im Kammernmyokard wieder. Bei gestörter Repolarisation (z.B. durch eine Funktionsstörung in hERG) kann es zu einer Verlängerung des QT-Intervalls kommen (rechtes Bild). Der Name LQT-Syndrom basiert auf einer derartigen Verlängerung des QT-Intervalls. **D:** EKG-Spur, die eine kardiale Arrhythmie vom Typ der Torsade de Pointes (TdP) zeigt. Das anfallartige Auftreten von TdPs ist ein weiteres Merkmal von LQT-Syndromen. **C** und **D** sind modifiziert nach Sanguinetti & Tristani-Firouzi (2006).

Heute sind ca. 200 LQTS-verbundene Mutationen in *HERG* bekannt. Die meisten dieser Mutationen resultieren in Fehlfaltungen der hERG-Untereinheiten oder in einer fehlerhaften intrazellulären Proteinsortierung (Trafficking) zur Plasmamembran (Sanguinetti & Tristani Firouzi, 2006). Mutationen in hERG können dominant

negative Effekte haben, wenn Wildtyp und mutante Untereinheiten zusammenlagern (Sanguinetti *et al.*, 1996; Kagan *et al.*, 2000).

In heterologen Expressionssystemen konnte die Zusammenlagerung von porenbildenden hERG- α -Untereinheiten mit den β -Untereinheiten MinK (McDonald *et al.*, 1997) und MiRP1 (Abbott *et al.*, 1999) sowie eine Einflussnahme dieser β -Untereinheiten auf die hERG-Kanal-Aktivität gezeigt werden. Mutationen in MiRP1 werden mit Störungen des durch hERG-K⁺-Kanäle vermittelten kardialen I_{Kr} -Stroms in Verbindung gesetzt und verursachen das LQT6-Syndrom (Abbott *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2003).

HERG-Kanäle können von Chemikalien mit diversen Strukturen blockiert werden, darunter verschiedene therapeutische Arzneimittel, wie Antiarrhythmika, Antihistamine, psychiatrische und antimikrobielle Arzneien (zur Übersicht siehe Sanguinetti & Tristani-Firouzi, 2006).

1.4.2 Der Kaliumkanal Kir2.1

Einwärts-gleichrichtende Kir-Kanäle (*K⁺ inward rectifying channels*) bilden eine bedeutende Gruppe von K⁺-Kanälen. Sie sind generell an der Erregbarkeit von Membranen und damit u.a. der Herzfrequenz, der Kontraktion der Gefäß-Muskulatur, der Insulin-Ausschüttung und dem Salzfluss über Epithelien beteiligt. Die Bezeichnung Einwärts-Gleichrichter beruht auf der Fähigkeit, einen größeren Influx als Efflux von Ionen zuzulassen. Im Falle der Kir-Kanäle wird die Einwärts-Gleichrichtung durch zytoplasmatische Ionen wie Polyamine und Mg²⁺ verursacht (Ficker *et al.*, 1994; Stanfield *et al.*, 1994; Lopatin *et al.*, 1994; Fakler *et al.*, 1995). Diese Kationen binden bei depolarisierter Membran von innen an die Kanalpore und verhindern somit den Auswärts-Fluss von K⁺. Bei Membranspannungen, die wenig positiver als das Gleichgewichtspotential für K⁺-ionen (E_K) waren, konnten jedoch bei Kir2.1 leichte [Polyamin]_i- und [K⁺]_a-abhängige Auswärtsströme von K⁺ beobachtet werden (Ischihara & Ehara, 2004; Yan *et al.*, 2005; Panama & Lopatin, 2006). Kir-Kanäle sind ebenfalls Tetramere, wobei jede Untereinheit zwei Transmembransegmente, eine Porenregion sowie zytoplasmatische C- und N-terminale Domänen aufweist (Yang *et al.*, 1995; Raab-Graham & Vandenberg, 1998; Bichet *et al.*, 2003; Abb. 1.1 A).

Das Kir2.1-Gen wurde 1993 bei der Maus und 1994 beim Menschen isoliert (Kubo *et al.*, 1993; Raab-Graham *et al.*, 1994). Die cDNA codiert jeweils für ein relativ kleines Protein aus 427 Aminosäuren. Auf Aminosäureebene sind Maus-Kir2.1 (mKir2.1) und humanes Kir2.1 zu 98,6% identisch. Eine starke Transkription des Kir2.1-Gens *KCNJ2* findet beim Menschen in Herz, Skelettmuskel, Gehirn, Plazenta und Lunge statt, eine weniger starke Transkription in der Niere (Schulze-Bahr, 2005). Mutationen in *KCNJ2* wurden als eine Ursache für die erbliche Form des Andersen Syndrom (Andersen-Tawil-Syndrom, Andersen *et al.*, 1971, Tawil *et al.*, 1994) erkannt (Plaster *et al.*, 2001; Ai *et al.*, 2002; Tristani-Firouzi *et al.*, 2002; Donaldson *et al.*, 2003; Ballester *et al.*, 2006). Symptome dieser seltenen Krankheit sind periodisch auftretende Lähmungen, Herzrhythmusstörungen und Anomalien der Skelettentwicklung (Andersen *et al.*, 1971; Tawil *et al.*, 1994; Plaster *et al.*, 2001). Aufgrund des Auftretens von verlängerten QT-Intervallen im Oberflächen-EKG wurde das Andersen Syndrom als LQT7-Syndrom klassifiziert (Tristani-Firouzi *et al.*, 2002). Nach Wible *et al.*, (1995) und Yan & Ishihara (2005) steuert Kir2.1 wesentlich zum kardialen Einwärtsgleichrichter-Strom I_{K1} bei, welcher nach aussen gerichtet ist und die Rückführung zum Ruhepotential sowie dessen Stabilisierung bis zum Eintreffen des nächsten elektrischen Signals bewirkt (siehe Abb. 1.5 A, Bc und 1.6). Beim LQT7-Syndrom kommt es, ausgelöst durch Mutationen in *KCNJ2* zu einer Reduzierung von I_{K1} und somit zu einer Verlängerung der terminalen Repolarisationsphase des kardialen Aktionspotentials (Jongsma & Wilders, 2001, Tristani-Firouzi *et al.*, 2002). Weiterhin wird eine *gain-of-function*-Mutation in *KCNJ2* mit einer Verkürzung des QT-Intervalls im EKG (Short QT-Syndrom 3) in Verbindung gebracht (Priori *et al.*, 2005). Der kardiale I_{K1} Strom wird in diesem Fall verstärkt. Damit einhergehend konnte bei Überexpression von *mKir2.1* in Herzmuskelzellen aus Meerschweinchen ein verstärkter I_{K1} -Strom, wie auch ein verkürztes Aktionspotential beobachtet werden (Miake *et al.*, 2003).

Eine weitere wichtige Funktion von Kir2.1 im menschlichen Gewebe ist seine Rolle bei der Regulation des Blutflusses (Sobey & Faraci, 2000; Chilton & Loutzenhiser, 2001; Chrissobolis & Sobey, 2003; Haddy *et al.*, 2006). Leichte Erhöhungen der extrazellulären K^+ -Konzentrationen führten zu einem erhöhten auswärts gerichteten K^+ -Strom, der insbesondere Kir2.1 zugeschrieben wird. Dieser Auswärtsstrom verursacht eine Hyperpolarisation der Plasmamembran, was wiederum eine

Erschlaffung der Gefäßmuskulatur und damit eine Gefäßerweiterung bewirkt (Sobey & Faraci, 2000).

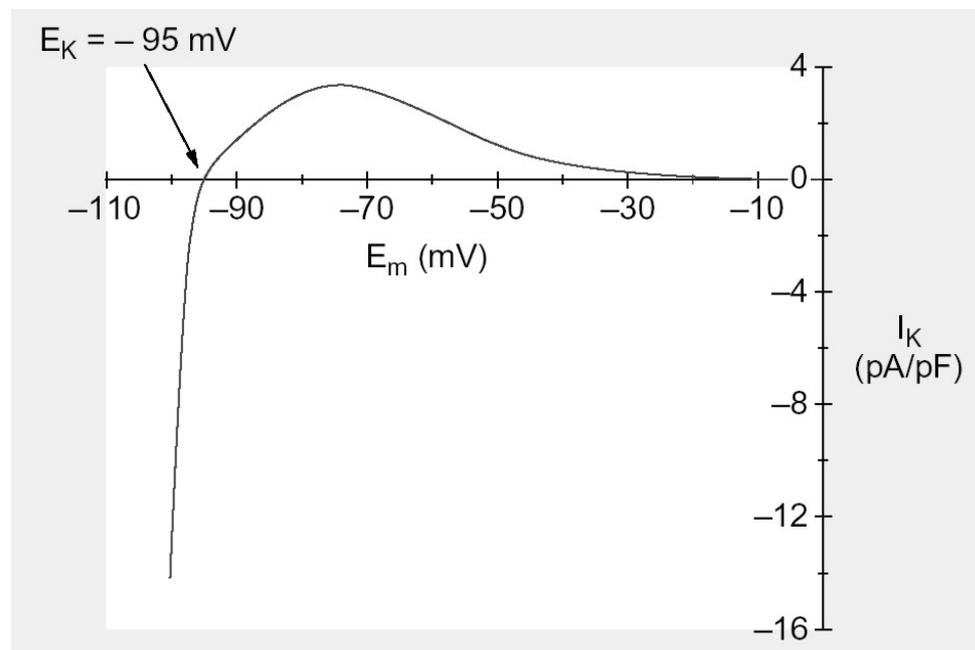


Abb. 1.6: Strom-Spannungsdiagramm des kardialen Einwärtsgleichrichterstroms I_{K1} (nach Jongasma & Wilders, 2001): Der kardiale Strom I_{K1} trägt wesentlich zum kardialen Ruhepotential bei und wird nach Wible *et al.* (1995) wesentlich durch Kir2.1 gesteuert. Für gewöhnlich ist das kardiale Ruhepotential (E_m) etwas weniger negativ als das K^+ -Gleichgewichtspotential (E_K), so dass I_{K1} durch leichte K^+ -auswärts-Ströme das Ruhepotential stabilisiert. Bei Membrandepolarisierung infolge eines Aktionspotentials kommt es bei Membranspannungen oberhalb von etwa -40 mV zu einer nahezu vollständigen Inaktivierung von I_{K1} .

Die Regulation von Kir2.1 erfolgt über zwei wichtige Faktoren, die Protein Phosphorylierung und die Interaktion mit Phosphoinositiden (Romanenko *et al.*, 2004). Als Aktivator von Kir2.1 wurde Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) erkannt (Huang *et al.*, 1998; Soom *et al.*, 2001), als Inhibitor Phosphorylierung durch eine Tyrosin-Kinase (Wischmeyer *et al.*, 1998; Tong *et al.*, 2001). In Endothelzellen des Säuger-Gefäßsystems werden allerdings abhängig von einer Tyrosin-Kinase-Aktivität Kir2.1 vermittelte Ströme durch Scherung infolge des Blutflusses stimuliert (Hoger *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung durch Proteinkinase A (PKA) führte zu einer Modulierung der Aktivität von Kir2.1, allerdings wurden sowohl aktivierende (Fakler *et al.*, 1994, Dart & Leyland, 2004) and auch inhibierende Wirkungen (Wischmeyer & Karschin, 1996) beschrieben. Nach Fakler *et al.* (1994) und Jones (1996) werden Kir2.1 vermittelte Ströme durch die Proteinkinase C (PKC) inhibiert. Zudem wird eine

Regulation von Kir2.1 durch Phosphatasen beschrieben (Wischmeyer & Karschin, 1996; Ruppertsberg & Fakler, 1996; Tong *et al.*, 2001).

Ein Inaktivierungsprozess, wie z.B. bei hERG ist für Kir2.1 nicht bekannt (Kubo *et al.*, 2005)

1.5 Trafficking von heterolog exprimierten Plasmamembranproteinen

Wie unter 1.2.2 beschrieben, scheitert die heterologe Expression von Plasmamembranproteinen im Expressionssystem Hefe nicht selten an einer fehlenden Plasmamembranlokalisation. Somit soll im Folgenden ein Überblick über die intrazelluläre Proteinsortierung (Trafficking) von Plasmamembranproteinen und Strategien zum Erreichen einer Oberflächenlokalisation von fehlgeleiteten heterologen Plasmamembranproteinen gegeben werden. Plasmamembranproteine werden in der Regel über den sekretorischen Weg zu ihrem Ziel transportiert (zur Übersicht siehe Ellgaard *et al.*, 1999). Sie werden im ER synthetisiert und sofort gefaltet, glykosyliert sowie die Untereinheiten zusammengelagert. Fehlerhaft gefaltete Proteine oder unvollständig zusammengelagerte Untereinheiten eines Proteins sind gewöhnliche Nebenprodukte der Proteinsynthese. Sie werden von Mechanismen der Qualitätskontrolle erkannt und am Weitertransport entlang des sekretorischen Weges gehindert. Kann der Faltungsdefekt nicht durch ER assoziierte Chaperone beseitigt werden, so wird das Protein ins Zytoplasma retrotranslokiert und dort durch das Proteasom degradiert (Ellgaard *et al.*, 1999). Die Dichte von Rezeptoren und Kanälen an der Zelloberfläche kann beim Übergang vom ER zum Golgi-Apparat durch bestimmte Aminosäure-Motive beeinflusst werden: ER-Retentions- oder ER-Wiedergewinnungssignaturen können die Oberflächenlokalisation verringern und ER-Exportsignale können sie erhöhen (Ma & Jan, 2002). Am C-Terminus der hERG-Kanaluntereinheit befindet sich z.B. das Aminosäure-Motiv RXR, welches ein solches ER-Retentionssignal darstellt (Kupersmidt *et al.* 2002), wobei X in diesem Fall ein Glycin-Rest ist. Man nimmt an, dass Proteine im ER zurückgehalten werden, bzw. weitergeleitete Proteine ins ER zurückgeführt werden, wenn das ER-Retentionssignal aufgrund einer fehlerhaften Faltung oder fehlerhaften Zusammenlagerung der Untereinheiten demaskiert vorliegt (Zerangue *et al.*, 1999; O'Kelly *et al.*, 2002). Neben ER-Retentionssignalen sind auch

eine Reihe von ER-Exportsignalen bekannt, die den Export von Proteinen aus dem ER ermöglichen oder erleichtern (Barlowe, 2003). Ein derartiges Exportsignal stellt die Aminosäuresequenz FCYENE aus dem Kaliumkanal Kir2.1 dar. Der Austausch einzelner Aminosäuren an fünf Stellen des Motivs führte bei der Expression in *Xenopus* Oozyten zu einem Verlust detektierbarer Plasmamembranlokalisation von Kir2.1-GFP Fusionsproteinen. Andererseits konnte durch Fusion von FCYENE an andere Kaliumkanäle und G-Protein gekoppelte Rezeptoren deren Anzahl an der Zelloberfläche erhöht werden (Ma *et al.*, 2001).

Eine wachsende Anzahl von Untersuchungen haben gezeigt, dass sogenannte chemische Chaperone die Funktion von mislokalisierten Proteinen restaurieren können. Chemische Chaperone wie 4-Phenyl-Buttersäure (PBA), Trimethylaminoxid (TMAO) und Dimethylsulfoxid (DMSO) sind eine Gruppe von niedermolekularen Substanzen, von denen bekannt ist, dass sie Proteinkonformationen stabilisieren, die Faltung von Proteinen im ER verbessern und das Trafficking von mutanten Proteinen erleichtern können (Perlmutter, 2002). Man nimmt an, dass die Aktivitäten der chemischen Chaperone zur Stabilisierung und Faltung von Proteinen nicht selektiv erfolgen. Viele chemische Chaperone sind osmotisch aktiv, wie z.B. DMSO oder Glycerol. Verschiedene Untersuchungen (Sato *et al.*, 1996; Bebök *et al.*, 1998 und Choo-Kang & Zeitlin, 2001) konnten zeigen, dass die Applikation von 10 % Glycerol, 50 mM Glutamin oder 2 % DMSO in Säuger-Zelllinien zu einer vermehrten Reifung und Oberflächenexpression von defekten Plasmamembranproteinen führen konnte. Zeng *et al.* (2004) konnten in *S. cerevisiae* $\Delta trk1,2$ -K⁺-Aufnahme-Mutanten durch Applikation von 5-10 % Glycerol die Oberflächenlokalisation des plasmidally exprimierten endogenen Plasmamembranproteins Trk2p deutlich erhöhen.

Der auf den Zielort gerichtete (anterograde) Transport von fertig gefalteten und vollständig zusammengelagerten Plasmamembranproteinen führt über Protein-umhüllte Membranvesikel (COPII-Vesikel) zum Golgi-Apparat. Proteine treten auf der cis-Seite des Golgi-Apparates ein und werden dann zur gegenüberliegenden Trans-Seite transportiert. Auf diesem Wege werden sie in der Regel weiter glykosyliert. Die Sortierung der Proteine, die den Biosyntheseweg durchlaufen, erfolgt zu einem großen Teil im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), dem letzten Kompartiment des Golgi-Apparates. Proteine der Plasmamembran werden in Proteinhüllen-freien Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert, wo die Vesikel mit der Plasmamembran verschmelzen (Karp, 2005).

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war zunächst die Expression der Säuger-Kaliumkanäle hERG und mKir2.1 in *S. cerevisiae* und deren Charakterisierung. Ein Schwerpunkt der Arbeit sollte dabei die Ermittlung und Optimierung von signifikanten, auf den funktionell exprimierten heterologen K⁺-Kanälen basierenden Wachstumsphänotypen in der Hefe sein. Daher wurden die beiden K⁺-Kanalgene in *S. cerevisiae* K⁺-Aufnahme-Mutanten zur Komplementation des mutanten Wachstumsphänotyps exprimiert.

Als weitergefasstes Ziel sollte mit den erhaltenen *S. cerevisiae* Stämmen ein Testsystem aufgebaut werden, mit dem ein weitgehend automatisiertes auf Wachstumsparametern beruhendes Screening von Modulatoren von hERG und Kir2.1 durchführt werden könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

2.1.1 *S. cerevisiae* Stämme

Tab. 2.1: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Hefestämme

Stamm	Genotyp	Selektionsmedium	Referenz
PLY232	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9</i>	SDAP	Bertl <i>et al.</i> , 2003
PLY238	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 tok1Δ1::HIS3</i>	SDAP ΔHIS	Bertl <i>et al.</i> , 2003
PLY240	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX</i>	SDAP	Bertl <i>et al.</i> , 2003
PLY246	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX tok1Δ1::HIS3</i>	SDAP ΔHIS	Bertl <i>et al.</i> , 2003
PLY240L-GFP	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX leu2::P_{PMA1}-gfp</i>	SDAP ΔLEU	Laborstamm (B. Kirberg)
PLY246L-GFP	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX tok1Δ1::HIS3 leu2::P_{PMA1}-gfp</i>	SDAP ΔLEU	Laborstamm (B. Kirberg)
PLY240T-GFP	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX tok1::P_{PMA1}-GFP</i>	SDAP ΔLEU	Laborstamm (B. Kirberg)
PLY240 [pYEX-GFP]	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX [pYEX-GFP]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA	Laborstamm (B. Kirberg)
PLY240 [pYEX-GFP-TRK1]	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX [pYEX-GFP-TRK1]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA	Laborstamm (B. Kirberg)
PLY240 [pYEX-GFP-TRK2]	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX [pYEX-GFP-TRK2]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA	Laborstamm (B. Kirberg)
PLY240L-HERG	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX leu2::P_{PMA1}-HERG</i>	SDAP ΔLEU	Laborstamm (B. Kirberg)

Stamm	Genotyp	Selektionsmedium	Referenz
PLY240L-HERG-GFP	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX leu2::P_{PMA1}-HERG-GFP</i>	SDAP ΔLEU	Laborstamm (B. Kirberg)
PLY246L-HERG-GFP	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX tok1Δ1::HIS3 leu2::P_{PMA1}-HERG-GFP</i>	SDAP ΔLEU ΔHIS	Diese Arbeit
PLY240T-HERG	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX tok1::P_{PMA1}-HERG</i>	SDAP ΔLEU	Laborstamm (B. Kirberg)
PLY240T-HERG-GFP	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX tok1::P_{PMA1}-HERG-GFP</i>	SDAP ΔLEU	Laborstamm (B. Kirberg)
PLY246 [pYEx-HERG-GFP]	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX tok1Δ1::HIS3 [pYEX-HERG-GFP]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA ΔHIS	Diese Arbeit
PLY240[pYEx-GFP-HERG]	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX [pYEX-GFP-HERG]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA	Diese Arbeit
PLY246 [pYEx-GFP-HERG]	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX tok1Δ1::HIS3 [pYEX-GFP-HERG]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA ΔHIS	Diese Arbeit
PLY240[pYEx-GFP-HERG _{LGL}]	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX [pYEX-GFP-HERG_{LGL}]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA	Diese Arbeit
PLY246 [pYEx-GFP-HERG _{LGL}]	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX tok1Δ1::HIS3 [pYEX-GFP-HERG_{LGL}]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA ΔHIS	Diese Arbeit
PLY240 [pYEx-GFP-HERG _{LGL} FCYENE]	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX [pYEX-GFP-HERG_{LGL} FCYENE]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA	Diese Arbeit
PLY246 [pYEx-GFP-HERG _{LGL} FCYENE]	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX tok1Δ1::HIS3 [pYEX-GFP-HERG_{LGL} FCYENE]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA ΔHIS	Diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Selektionsmedium	Referenz
PLY240T-GFP-mKir2.1	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX tok1::P_{PMA1}-GFP-mKir2.1</i>	SDAP ΔLEU	Laborstamm (B. Kirberg)
PLY240L-GFP-mKir2.1	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX leu2::P_{PMA1}-gfp-mKir2.1</i>	SDAP ΔLEU	Laborstamm (B. Kirberg)
PLY240 [pYEX-GFP-mKir2.1]	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX [pYEX-GFP-mKir2.1]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA	Diese Arbeit
PLY246 [pYEX-GFP-mKir2.1]	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX tok1Δ1::HIS3 [pYEX-GFP-mKir2.1]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA ΔHIS	Laborstamm (B. Kirberg)
PLY240 [pYEX-GFP-TRK1]	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX [pYEX-GFP-TRK1]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA	Laborstamm (B. Kirberg)
PLY240 [pYEX-GFP-TRK2]	<i>MATa his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX [pYEX-GFP-TRK2]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA	Laborstamm (B. Kirberg)
B31	<i>MATα ade 2-1 can1-100 his3-11/15 leu2-3/112 mal10 trp1-1 ura3-1 ena1-4Δ::HIS3 nha1Δ::LEU2</i>	SDAP ΔLEU ΔHIS	Banuelos <i>et al.</i> , 1998
B31 [pYEx-GFP]	<i>MATα ade 2-1 can1-100 his3-11/15 leu2-3/112 mal10 trp1-1 ura3-1 ena1-4Δ::HIS3 nha1Δ::LEU2 [pYEx-GFP]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA ΔHIS	Kolacna <i>et al.</i> , 2005
B31 [pYEx-GFP-mKir2.1]	<i>MATα ade 2-1 can1-100 his3-11/15 leu2-3/112 mal10 trp1-1 ura3-1 ena1-4Δ::HIS3 nha1Δ::LEU2 [pYEx-GFP-mKir2.1]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA ΔHIS	Kolacna <i>et al.</i> , 2005
MAB 2d	<i>MATα ade 2-1 can1-100 his3-11/15 leu2-3/112 mal10 trp1-1 ura3-1 trk1Δ::LEU2 trk2Δ::HIS3 ena1-4Δ::HIS3 nha1Δ::LEU2</i>	SDAP ΔLEU ΔHIS	Maresova & Sychrova, 2005
MAB 2d [pYEx-GFP]	<i>MATα ade 2-1 can1-100 his3-11/15 leu2-3/112 mal10 trp1-1 ura3-1 trk1Δ::LEU2 trk2Δ::HIS3 ena1-4Δ::HIS3 nha1Δ::LEU2 [pYEx-GFP]</i>	SDAP ΔLEU ΔURA ΔHIS	Kolacna <i>et al.</i> , 2005

Stamm	Genotyp	Selektionsmedium	Referenz
MAB 2d [pYEx-GFP-mKir2.1]	<i>MATα ade 2-1 can1-100 his3-11/15 leu2-3/112 mal10 trp1-1 ura3-1 trk1Δ::LEU2 trk2Δ::HIS3 ena1-4Δ::HIS3 nha1Δ::LEU2</i> [pYEx-GFP-mKir2.1]	SDAP Δ LEU Δ URA Δ HIS	Kolacna <i>et al.</i> , 2005
PLY246-ne [pYEx-GFP]	<i>MATα his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX tok1Δ1::HIS3 ena1-4Δ nha1Δ kan^r</i> [pYEx-GFP]	SDAP Δ LEU Δ URA Δ HIS	H. Sychrova (Prag)
PLY246-ne [pYEx-GFP-mKir2.1]	<i>MATα his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 suc2-Δ9 trk1Δ51 trk2Δ50::kanMX tok1Δ1::HIS3 ena1-4Δ nha1Δ kan^r</i> [pYEx-GFP-mKir2.1]	SDAP Δ LEU Δ URA Δ HIS	H. Sychrova (Prag)

2.1.2 *Escherichia coli*

Tab. 2.2: Genotyp und Herkunft des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stammes

Stamm	Genotyp	Herkunft
Escherichia coli XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac^fZΔM15 Tn10 (Tet^r)</i>].	Stratagene (La Jolla, USA)

2.2 Chemikalien und Medien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Nährmedien wurden, wenn nicht explizit erwähnt, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), VWR (Darmstadt) und Labomedic (Bonn) verwendet und entsprechen mindestens dem Reinheitsgrad pro Analysis (pA). Für die molekularbiologischen Arbeiten verwendeten Restriktionsendonukleasen, Polymerasen, Kinasen und Ligasen wurden von den Firmen Fermentas, St. Leon-Rot bzw. Roche, Mannheim bezogen. Nukleinsäure-modifizierende Enzyme wurden von der Firma Fermentas, St. Leon-Rot

verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Medien, Puffer und sonstigen Lösungen sind in Tab. 2.3 aufgelistet.

Tab. 2.3: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Puffer, Lösungen und Supplemente. Aufgelistet sind die verwendeten Puffer, Lösungen und Supplemente und ihre jeweilige Zusammensetzung.

Bezeichnung	Definition
Blot-Puffer	25 mM Tris; 150 mM Glycin; 20 % Ethanol; pH 8,3
Bradford-Reagenz	100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250; 50 ml 95 % Ethanol; 100 ml 85 % Phosphorsäure
Denaturierungspuffer	12,5 µl MOPS-Puffer (10 x); 22,6 µl Formaldehyd (37 % (w/v)); 64,5 µl Formamid (deionisiert)
Drop-out-Mix	100 mg Arginin; 100 mg Asparagin; 100 mg Glutaminsäure; 150 mg Lysin; 100 mg Methionin; 250 mg Phenylalanin; 500 mg Serin; 500 mg Threonin; 500 mg Tryptophan; 150 mg Tyrosin; 300 mg Valin
Ladepuffer	30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylen Cyanol in 6x TAE-Puffer
LB (Luria Bertani)-Medium (1 l)	25 g Luria Broth Base (Gibco) in A. dest; autoklaviert; bei einer Temperatur von ca. 40 °C ggf. 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin oder 15 µg/ml Tetracyclin hinzugefügt.
Lithiumacetat Stammlösung 10x	1 M Lithiumacetat ; pH 7,5
Lithiumacetat/Glycerin-Puffer (5 ml)	0,5 ml 10x TE-Puffer II; 0,5 ml 1 M Lithiumacetat; 0,5 ml 99 % Glycerin; 3,5 ml Milli-Q-Wasser
Lithiumacetat/Glycerin-Puffer (täglich frisch ansetzen) (5 ml)	0,5 ml 10x TE-Puffer II (s.u.), 0,5 ml 10x Lithiumacetat Stammlösung (s.o.), 0,5 ml 99 % (w/v) Glycerin, 3,5 ml Milli-Q-Wasser
Lithiumacetat-Puffer (täglich frisch ansetzen) (5 ml)	0,5 ml 10x TE-Puffer II (s.u.); 0,5 ml 10x Lithiumacetat Stammlösung (1 M Lithiumacetat, pH 7,5); 4 ml A. Milli-Q-Wasser
Milli-Q-Wasser	demineralisiertes, ultrareines Wasser, Widerstand $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, wurde jeweils autoklaviert
Minipräparation: Lösungen	Lösung 1: 50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA in Milli-Q-Wasser gelöst; pH 8,0 mit NaOH eingestellt Lösung 2: 0,2 M NaOH; 1 % SDS in Milli-Q-Wasser gelöst Lösung 3: 3 M Kaliumacetat in Milli-Q-Wasser gelöst; pH 4,8 mit KOH eingestellt
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 1,4 mM KH_2PO_4 ; pH 7,3
PBST	PBS + 0,1 % (v/v) Tween-20

Bezeichnung	Definition
P/C	Phenol (pH > 7,4)/Chloroform im Verhältnis 1:1
PEG-Lösung	in Wasser gelöstes 50 % Polyethylenglycol (PEG) 4000; autoklaviert
Ponceau-Lösung	0,2 % Ponceau S in 5 % Essigsäure
Probenpuffer	4 % SDS; 0,1 M Tris (pH 6,8); 4 mM EDTA; 20 % Glycerin; 2 % 2-mercapto-Ethanol; 0,02 % Bromphenol-Blau
Protoplastenpuffer A-C	Puffer A: 50 mM KH_2PO_4 , pH 7,0 (KOH); Puffer B: 2,4 M Sorbitol, 50 mM KH_2PO_4 , pH 7,0 (KOH); Puffer C: 1 M Sorbitol, 10 mM HEPES, pH 7,0 (KOH). Alle Puffer wurden in Milli-Q-Wasser gelöst.
Sammelgel	5,6 ml A. bidest; 0,9 ml 30 % Acrylamid; 0,375 ml 2 % Bisacrylamid; 1,6 ml Gelpuffer (3 M Tris/HCl pH 8,45; 0,3 % SDS); 75 μl 10% APS, 20 μl TEMED
säuregewaschene Glasperlen	Glasperlen (0,425 - 0,6 mm, Sigma, Taufkirchen) wurden 1 h in konzentrierter Salpetersäure (HNO_3) gerührt. Anschließend wurde so lange in A. dest. gewaschen, bis ein neutraler pH wieder erreicht war. Dann wurden die Glasperlen bei 60 °C getrocknet.
SDAP-Medium fest (1 l) *) **)	1,74 g L-Arginin; 0,5 g „Drop-out-Mix“; 1 ml 2 M MgSO_4 ; 1 ml 0,2 M CaCl_2 und 10 ml Spurenelemente (100x) in Milli-Q-Wasser aufgenommen; pH 5,9 mit ortho-Phosphorsäure eingestellt; 20 g Agar Agar hochrein; Lösung autoklaviert; bei anschließender Abkühlung auf eine Temperatur von ca. 60 °C 10 ml 100x Vitaminlösung; 50 ml 40 % Glucose und ggf. KCl Selektionsmarker oder weitere Salze oder Zuckeralkohole hinzugegeben. Für alle Einzellösungen wurde Milli-Q-Wasser als Lösungsmittel verwendet.
SDAP-Medium flüssig (1 l) *)	1,74 g L-Arginin; 0,5 g „Drop-out-Mix“; 1 ml 2 M MgSO_4 ; 1 ml 0,2 M CaCl_2 und 10 ml Spurenelemente (100x) in Milli-Q-Wasser aufgenommen; pH mit ortho-Phosphorsäure eingestellt; Lösung autoklaviert; bei anschließender Abkühlung auf eine Temperatur von ca. 50 °C 10 ml Vitaminlösung (100x); 12,5 ml 40 % Glucose und ggf. KCl oder weitere Salze oder Zuckeralkohole hinzugegeben. Für alle Einzellösungen wurde Milli-Q-Wasser als Lösungsmittel verwendet.
SDAP-Medium flüssig und gepuffert (1 l) *)	wie SDAP-Medium flüssig, aber vor Einstellung des pH Zugabe von 20 mM MES für Medien mit pH 5.9 oder 20 mM MOPS für Medien mit pH 7
Selektionsmarker (100x für SDAP-Medien)	Histidin: 2 mg/ml; Leucin: 4 mg/ml; Uracil: 2 mg/ml. Alle Lösungen wurden mit Milli-Q-Wasser angesetzt

Bezeichnung	Definition
„Smash and grab“-Lösung	1 % SDS; 2 % TritonX-100; 100 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl (pH 8,0 wurde mit NaOH eingestellt); 1 mM EDTA (pH 8,0 wurde mit NaOH eingestellt) in Milli-Q-Wasser.
SOB-Medium (1 l)	20 g Casein-Hydrolysat oder Bacto-Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,5 g NaCl; 0,2 g KCl wurden in A. dest gelöst; pH 7,0 mit NaOH eingestellt; die Lösung wurde autoklaviert
Spurenelemente (100x für SDAP-Medien)	Für alle Einzelkomponenten wurden jeweils Stammlösungen hergestellt. Im Folgenden sind jeweils die Konzentrationen in der 100x Spurenelementelösung und in Klammern die Konzentration der jeweiligen Einzelstammlösung angegeben: 1,3 mM FeNaEDTA (13 mM); 800 µM H ₃ B ₃ O ₃ (80 mM); 25 µM CuSO ₄ (25 mM); 60 µM KI (60 mM); 270 µM MnSO ₄ (27 mM); 100 µM Na ₂ MoO ₄ (10 mM); 250 µM ZnSO ₄ (25 mM); 50 µM CoCl ₂ (50 mM); 50 µM NiCl ₂ (50 mM). Alle Lösungen wurden mit Milli-Q-Wasser angesetzt.
SSC (10x)	1,5 M NaCl; 150 mM Zitronensäure gelöst in Wasser; pH 7,0 mit NaOH eingestellt
TAE-Puffer	0,04 M Tris-Acetat; 1 mM EDTA in demineralisiertem Wasser gelöst; pH 7,0 mit NaOH eingestellt
TB-Puffer	10 mM Pipes; 15 mM CaCl ₂ ; 250 mM KCl in Milli-Q-Wasser; pH 6,7 mit KOH eingestellt; 55 mM MnCl ₂ ; sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm); gelagert bei 4 °C
TBS	20 mM Tris/HCl ; 140 mM NaCl ; pH 7,5
TBST	TBS + 0,1 % Tween-20 (v/v)
TE-Puffer I 10x	100 mM Tris-HCl ; 10 mM EDTA ; pH 7,5
TE-Puffer II 10x	100 mM Tris-HCl ; 1 mM EDTA ; pH 7,5
TE-Puffer:	1 ml 10x TE-Puffer I (s.o.); 9 ml Milli Q
Trenngel	1,8 ml A. bidest; 3,2 ml 30 % Acrylamid; 1,5 ml 2 % Bisacrylamid; 3,35 ml Gelpuffer (3 M Tris/HCl pH 8,45; 0,3 % SDS) ; 1,15 ml Glycerin; 50 µl 10 % APS; 6,3 µl TEMED
TSN-Lösung	2 % TritonX-100; 1 % SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA in Wasser gelöst; pH 8 mit NaOH eingestellt

Bezeichnung	Definition
Vitaminlösung (100x)	Für alle Einzelkomponenten wurden jeweils Stammlösungen hergestellt. Im Folgenden sind jeweils die Konzentrationen in der 100x Vitaminlösung und in Klammern die Konzentration der jeweiligen Einzelstammlösung angegeben: 200 µg/l Biotin (200 mg/l); 40 mg/l Ca-Pantothenat (4 g/l); 200 µg/l Folsäure (200 mg/l); 200 mg/l Inositol (20 g/l); 40 mg/l Niacin (4 g/l); 20 mg/l p-Aminobenzoesäure (2g/l); 40 mg/l Pyridoxinhydrochlorid (4g/l); 40 mg/l Thiaminhydrochlorid (4 g/l). Alle Lösungen wurden mit Milli-Q-Wasser angesetzt.
YPD-Medium flüssig (1 l)	20 g Pepton; 10 g Hefeextrakt wurde in A. dest aufgenommen; Lösung autoklaviert; nach dem Abkühlen wurden 12,5 ml 40 % Glucose und ggf. KCl hinzugegeben
YPD-Medium fest (1 l)	20 g Pepton; 10 g Hefeextrakt wurde in A. dest aufgenommen; pH 5,9 mit NaOH eingestellt; danach Zugabe von 20 g Agar Agar, Lösung autoklaviert; nach dem Abkühlen wurden 50 ml 40 % Glucose und ggf. KCl hinzugegeben.

*) SDAP-Medien nach Rodriguez-Navarro und Ramos (1984)

***) Bei Zugabe von BaCl₂ zum Testansatz wurde MgSO₄ gegen MgCl₂ zu äquimolaren Konzentrationen von Mg²⁺ ausgetauscht

2.3 Verwendete Plasmide

Zur Expression von Fremdgenen in *S. cerevisiae* wurden Vektoren zur chromosomalen wie auch episomalen Expression verwendet: pYEx-BX (Clontech, Palo Alto, USA) ist ein *E. coli*/Hefe-Shuttle-Vektor zur episomalen Expression in hoher Kopienzahl. Als integrative Vektoren (siehe auch 2.6.5.2) zur chromosomalen Expression wurden der Vektor p774 (Doheny *et al.*, 1993) und der daraus abgeleitete Vektor p77x verwendet.

Tab. 2.4: Auflistung von schon bestehenden Plasmiden, auf die in dieser Arbeit zurückgegriffen wurde. Angegeben ist der jeweilige Plasmidname, der Promotor, der das zu exprimierende Gen in Hefe kontrolliert, im Plasmid enthaltene Selektionsmarker für Hefe und Bakterien (*kursiv*) und der Hersteller des Plasmids.

Name	Promotor	Selektionsmarker	Herkunft
p774 pma HERG	P_{PMA1}	LEU2, <i>amp^r</i>	J. Ludwig / B. Kirberg
p774 pma HERG-GFP	P_{PMA1}	LEU2, <i>amp^r</i>	J. Ludwig / B. Kirberg
p77x pma HERG-GFP	P_{PMA1}	LEU2, <i>amp^r</i>	J. Ludwig / B. Kirberg
pYEx-GFP	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>	B. Kirberg
pYEX-GFP-mKir2.1	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>	B. Kirberg / S. Schwarzer
pGEM [®] -T Easy			Promega

Tab. 2.5: Auflistung von neu konstruierten Plasmiden. Angegeben ist der jeweilige Plasmidname, der Promotor, der das zu exprimierende Gen in Hefe kontrolliert, im Plasmid enthaltene Selektionsmarker für Hefe und Bakterien (*kursiv*) und Verweise auf detaillierte Konstruktionsbeschreibungen zu den einzelnen Plasmiden im Anhang.

Name	Promotor	Selektionsmarker	Konstruktion siehe
pYEx-GFP-HERG	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>	Abb. 7.1
pYEX-GFP-HERG _{LGL}	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>	Abb. 7.2
pYEX-GFP-HERG _{LGL_FCYLENE}	P_{CUP1}	URA3, LEU2, <i>amp^r</i>	Abb. 7.3

2.4 Verwendete Oligonukleotide

Tab. 2.6: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide. Nicht-komplementäre Sequenzen sind **fett** dargestellt, Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und unter Bemerkungen genannt.

Name	Sequenz 5' → 3'	Restriktionsschnittstellen (R), Primer-Orientierung (P)
RGR-LGL_S	aaccgctcactgctgcagcac	P: Sinn-Primer
RGR-LGL-SacI_A	aggg <u>agctcct</u> ggtactg caagccca aactgtcccc	R : <i>SacI</i> P: Gegensinn-Primer
hERG_FCYENE	agaggaattcttattcatttcgtaacaaaaactgccc gggtccgagcc	R : <i>EcoRI</i> P: Gegensinn-Primer
herg_s5	cctcacctactgtgacctac	P: Sinn-Primer
herg_s6	gatggaggactgcgagaagag	P: Sinn-Primer
herg_s7	ctcgcttctcaggttccc	P: Sinn-Primer
B211	caactatcatctactaactag	P: Sinn-Primer
B046	ttgtaaacgacgccagtgga	P: Gegensinn-Primer
T187	aagagggccgctgctctctg	P: Sinn-Primer
T317	agttgggtaacgccagggtttcc	P: Gegensinn-Primer

2.5 Anzucht von Bakterienzellen

2.5.1 Bakterienflüssigkulturen

Als Inokulum einer Bakterienflüssigkultur wurde entweder Zellmaterial aus einer Bakterien-Kolonie einer Agarplatte oder Bakterienzellsuspension verwendet. Mit diesem Inokulum wurden 3-5 ml LB-Medium (Tab. 2.3) inokuliert. Die Kultur wurde über Nacht (15 h) bei 37 °C und 200 rpm auf einem Inkubationsschüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Zur Selektion von Plasmiden wurden dem LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

2.5.2 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

(modifiziert nach Inoue *et al.*, 1990)

Von *E. coli* XL1-Blue Zellen (Tab. 2.2) wurde ein Verdünnungsausstrich auf LB-Agarplatten + 15 µg/ml Tetracyclin (Tab. 2.3) gemacht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zu 125 ml 2fach konzentriertem SOB-Medium (Tab. 2.3) wurden in einem 1 l Erlenmeyerkolben je 1,25 ml 2 M Mg⁺⁺ gegeben das Medium mit dem Zellmaterial von jeweils sechs Kolonien inokuliert. Die Zellen wurden bei 22 °C auf einem Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,6 (entspricht ca. 2,5 – 5 x 10⁸ Zellen/ml) angezogen (Inkubationsdauer ca. 33 h). Anschließend wurden die Kulturen auf 50 ml Schraubdeckelröhrchen verteilt und für 10 min auf Eis gelagert. Danach wurden die Ansätze für 10 min bei 2500 g und 4 °C zentrifugiert (die Zentrifugeneinsätze wurden zuvor bei -20 °C abgekühlt). Die Pellets wurden dann jeweils in 20 ml eiskaltem TB-Puffer (Tab. 2.3) resuspendiert. Nach einem weiteren Inkubationsschritt für 10 min auf Eis wurden die Ansätze erneut für 10 min bei 2500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets jeweils in 5 ml eiskaltem TB-Puffer vorsichtig resuspendiert und die Bakteriensuspensionen in einem Gefäß auf Eis vereinigt. Nach Zugabe von 75 µl DMSO pro ml Bakteriensuspension wurde die Zellsuspension zügig in Aliquots zu jeweils 200 µl auf 1,5 ml Reaktionsgefäße auf Eis verteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.5.3 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Die folgenden drei Arbeitsschritte wurden jeweils auf Eis durchgeführt: 1.) Kompetente *E. coli* Zellen (2.5.2) wurden aufgetaut. 2.) In einem Volumenverhältnis von 10:1 wurden kompetente Zellen zu der zu transformierende DNA (10-100 ng) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und die Suspension vorsichtig gemischt. 3.) Der Ansatz wurde 20-30 min inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C im Wasserbad und dann eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Der Ansatz wurde auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin (Tab. 2.3) ausplattiert oder direkt als Inokulum einer Bakterienflüssigkultur (2.5.1) zugeführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.5.4 Bestimmung der Transformationseffizienz und der Reinheit kompetenter Bakterienzellen

Jeweils 80 µl kompetente Bakterienzellen (2.5.2) wurden mit 10 pg und 1 pg pUC18 DNA (EMBL #L09136) transformiert (2.5.3). Die Kolonien auf den Agarplatten wurden anschließend ausgezählt und die Transformationseffizienz wurde als Kolonie formende Einheiten (cfu, *colony forming units*) pro µg pUC18 DNA bestimmt. Nach Durchführung des Transformationsprotokolls (2.5.3) wurde eine Transformationseffizienz von $5-10 \times 10^7$ cfu/µg pUC18 DNA erreicht. Die Reinheit der kompetenten Bakterienzellen wurde kontrolliert, indem die restlichen 40 µl Zellen direkt auf LB_{amp}-Agarplatten (Tab. 2.3) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden.

2.6 Anzucht von Hefen

2.6.1 Hefevorkultur (flüssig)

Für eine Hefevorkultur wurden 20 µl einer Glycerinkultur oder Zellmaterial von einer auf Agarmedium gewachsenen Hefekolonie (2.6.2) als Inokulum verwendet. Hiermit wurden 3 ml SDAP-Medium in einem Glasröhrchen oder 10 ml SDAP-Medium in einem 50 ml Erlenmeyerkolben inokuliert. Die Zellsuspension wurde je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen 15-30 h bei 30 °C und 220 rpm (12,5 mm Amplitude) auf einem Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) inkubiert.

2.6.2 Hefevorkultur (fest)

10 µl einer Glycerinkultur oder Hefevorkultur wurden auf einer Agarplatte (SDAP-Medium fest mit entsprechenden Selektionsmarkern, Tab. 2.3) mit einem Verdünnungsausstrich verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C bis einzelne Kolonien zu sehen waren (i.d.R. nach 3-5 Tagen).

2.6.3 Glycerinkultur

Die Glycerinkultur dient der langfristigen Lagerung von Hefen bei -80 °C. Aus einer Hefevorkultur (2.6.1) wurden in der späten exponentiellen Phase Zellen entnommen

und lichtmikroskopisch untersucht. Bei Nachweis einer gesunden, homogenen Hefezellpopulation in der exponentiellen Wachstumsphase (Anteil sprossender Zellen im lichtmikroskopischen Bild > 70 %) wurden 1,5 ml dieser Hefevorkultur pelletiert. 800 µl des Überstands wurden verworfen und das Pellet im verbleibenden Überstand resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl sterilem 99 % (w/v) Glycerin (finale Glycerinkonzentration im Ansatz knapp 30 %) wurde der Ansatz gemischt und direkt bei –80 °C eingefroren.

2.6.4 Herstellung kompetenter Hefezellen nach der Lithiumacetat-Methode

(nach: Bröker, 1993; Zhao *et al.*, 1993)

50 ml SDAP-Medium (Tab. 2.3) wurden mit Zellmaterial von einer Agarplatte oder 20 µl einer Glycerinkultur inokuliert und bei 30 °C und 220 U/min auf einem Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Sobald die Zellsuspension eine optische Dichte von 0,5-1 erreichte und das mikroskopische Bild einen Anteil an knospenden, glatten Zellen von > 70 % aufwies wurde die Zellsuspension in 50 ml Röhrchen überführt und 5 min bei RT und 1500 g pelletiert. Danach wurde das Pellet in 10 ml TE-Puffer I (Tab. 2.3) resuspendiert und wieder 5 min bei RT und 1500 g pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 5 ml Lithiumacetat-Puffer resuspendiert (Tab. 2.3) und 1 h bei 30 °C und 200 U/min (Infors-Schüttler, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Die Suspension wurde wieder für 5 min bei RT und 1500 g pelletiert und das Pellet in 5 ml Lithiumacetat/Glycerin-Puffer (Tab. 2.3) resuspendiert. Die Zellen wurden in Aliquots zu 100 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäßen verteilt und zur Lagerung bei –80 °C tiefgefroren.

2.6.5 Transformation von *S. cerevisiae* Stämmen

Es wurde entweder eine Transformation mit sich episomal replizierender plasmidaler DNA zur Expression von Fremdgenen durchgeführt oder aber eine Transformation von Plasmiden zur Integration von Fremdgenen in das Hefegenom.

2.6.5.1 Transformation mit einem sich episomal replizierenden Plasmid

Transformiert wurden in diesem Fall ringförmige nicht-integrative Plasmide, von denen aus auch die Expression des gewünschten Gens erfolgen sollte. Selektiert wurde nach erfolgter Transformation auf auxotrophe Marker. Der Nachweis der erfolgreichen Transformation erfolgte über die „Plasmid recovery“-Methode (2.7.2). Sofern das episomalen Plasmid das Gen für das Fluorophor *yeGFP* (Cormack *et al.*, 1996) enthielt und in einen Hefestamm ohne Expression von *yeGFP* transformiert wurde, konnte durch Untersuchung der GFP-Fluoreszenz ebenfalls die erfolgreichen Transformation bestätigt werden.

2.6.5.2 Transformation zur chromosomalen Expression in den *Leu2*- oder *Tok1*-Locus von *S. cerevisiae*

Transformiert wurden in diesem Fall DNA-Konstrukte, die mit Hilfe von homologer Rekombination in den *Leu2*- oder *Tok1*-Lokus verschiedener Hefestämme integriert werden sollten. Die homologe Rekombination erfolgte über Sequenzen, die der 5'- bzw. 3'-nicht kodierenden Region des *Leu2*- oder *Tok1*-Gens entsprachen. Um dies zu ermöglichen, wurde das gewünschte Fremdgen in ein Plasmid (p774 bzw. p77x (Tab. 2.4)) eingebracht, das die entsprechende Sequenz des *Leu2*- oder *Tok1*-Gens, separiert durch singuläre Schnittstellen, enthielt. Wurde nun das Plasmid mit Hilfe einer entsprechenden Restriktionsendonuklease (i.d.R. *NotI*) zwischen dem 5'- und 3'-nicht-kodierenden Bereich des *Leu2*- oder *Tok1*-Gens linearisiert, lag die DNA auf einem Strang vor. Die darauf vorliegende Reihenfolge war dann 5'-kodierende Region, das zu inserierende Gen, 3'-kodierende Region. Die DNA wurde mittels der Phenol-Chloroform-Extraktion (2.7.5) gereinigt und mittels Ethanol-Fällung (2.7.6) gefällt. Diese DNA wurde anschließend zur Transformation verwendet.

Der Nachweis der korrekten Integration des Plasmids in den entsprechenden genomischen Locus erfolgte über eine PCR (2.7.13) mit dem Primerpaar B211 und B046 (Tab. 2.6) bei Integration in den *LEU2*-Locus und über das Primerpaar T187 und T317 (Tab. 2.6) bei Integration in den *TOK1*-Locus. Die Länge des PCR-Amplifikats wurde jeweils über eine Gelelektrophorese bestimmt.

2.6.5.3 Transformation von Hefezellen

(nach: Bröker, 1993; Zhao *et al.*, 1993)

In einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden zu 100 µl kompetenten Hefezellen (2.6.4) 1 µg Proben-DNA, 2 µl denaturierte (10 min in Wasserbad bei 98 °C, danach unmittelbar auf Eis) 0,5 µg/µl Heringspermien-DNA (Typ XIV) und 5 µl Ethanol gegeben. Der Ansatz wurde gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl 50 % (w/v) PEG 4000-Lösung (Tab. 2.3) wird der Ansatz vorsichtig gemischt und 1 h bei 30 °C und 200 rpm (Infors-Schüttler, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Danach wurde 15 min bei 46 °C im Wasserbad inkubiert (Hitzeschock). Nach 5 min Abkühlen bei RT wurde die Zellsuspension auf Selektionsagarplatten (2.6.2) und bis zu 7 Tage inkubiert.

2.6.6 „Plasmid Loss“ zum Entfernen von Plasmiden aus Hefen

3 ml YPD-Medium (Tab. 2.3) wurden mit Hefezellen mit einer OD₆₀₀ von 0,005 – 0,01 inokuliert und für 24 h bei 30 °C und 240 rpm auf einem Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1500 g zentrifugiert, das Pellet in Milli-Q Wasser aufgenommen, erneut zentrifugiert und das Pellet in YPD-Medium aufgenommen. 3 ml YPD-Medium wurden wieder zu einer OD₆₀₀ von 0,005 – 0,01 inokuliert und wie oben inkubiert. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Es war anzunehmen, dass die Zellen in Vollmedium ohne Selektionsdruck das Plasmid verlieren würden. Um dies zu überprüfen, wurden ca 250 Zellen auf YPD-Agarplatten (Tab. 2.3) ausgestrichen und zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Die Klone wurden auf einer Selektions-Agarplatte (2.6.2) replika-plattiert (2.6.9) und ebenfalls für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Das Wachstum der Zellen auf beiden Platten wurde verglichen. Von Kolonien, die nur auf Vollmedium wuchsen, wurde zur Kontrolle mit einem Zahnstocher Zellmaterial auf YPD-Agarplatte und Selektions-Agarplatte ausgestrichen und erneut 5 –10 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.6.7 Bestimmung der Populationsgröße

Die Populationsgröße einer Zellsuspension wurde über die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) in einem UV-VIS-Spektralphotometer (Shimadzu, Duisburg) ermittelt. Über eine Eichreihe konnte eine deutliche Korrelation von Zellzahl, ermittelt in einer

Thomakammer (Laboroptik, Friedrichsdorf; Tiefe: 0,1 mm; Fläche C-Quadrat: 0,025 mm², zur Theorie siehe Bast, 1999) und der OD₆₀₀ in einem OD₆₀₀-Meßwertebereich von 0,1 und 0,4 festgestellt werden. In diesem Messbereich entsprach einer OD₆₀₀ von 0,1 eine Zelldichte von $1,2 \cdot 10^6$ Zellen pro ml. Oberhalb einer OD₆₀₀ von 0,4 nahm das Verhältnis OD₆₀₀ / Zelldichte deutlich ab.

2.6.8 Herstellung von Protoplasten

(nach Anleitung von C. Crotty, York)

Von einer Hefekolonie auf einer Agarplatte (2.6.2) wurden 25 ml SDAP-Medium (Tab. 2.3) inokuliert und 15 h bei 30 °C und 220 U/min auf einem Inkubationsschüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. 5 ml der Zellsuspension wurden für 5 min bei 500 g zentrifugiert und das Pellet in 10 ml Protoplastenpuffer A (Tab. 2.3) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut für 5 min bei 500 g zentrifugiert, das Pellet in 4 ml Protoplastenpuffer A resuspendiert und die Zellsuspension in ein 15 ml-Schraubdeckelröhrchen überführt. 5,5 µl einer 14,2 M β-Mercaptoethanollösung wurden der Zellsuspension zugegeben (zu einer finalen β-Mercaptoethanolkonzentration von 20 mM). Der Ansatz wurde 30 min unter gelegentlichem Invertieren bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurden 5 mg Zymolyase und 50 mg BSA zu 3 ml Protoplastenpuffer B (Tab. 2.3) gegeben und vorsichtig in Lösung gebracht (Blasen vermeiden!). Nach der Inkubation der Zellsuspension wurde die präparierte Lösung in Protoplastenpuffer B in die Zellsuspension überführt und dem Ansatz 4,5 µl einer 14,2 M β-Mercaptoethanollösung (zu einer finalen β-Mercaptoethanolkonzentration von 20 mM) zugegeben. Der Ansatz wurde anschließend für 10 s stark durchmischt („gevortext“). Nach Überführung der Zellsuspension in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß wurde der Ansatz für 1 h im Wasserbad unter leichtem Schütteln bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 200 g zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen (und zur Sicherheit aufbewahrt) und das Pellet in 2 ml Protoplastenpuffer C (Tab. 2.3) vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gekühlt.

2.6.9 Replika-Plattierung von Hefezellen

Eine Hefesuspension wurde soweit verdünnt bis 200 µl Medium ca. 250 Hefezellen enthielten. Diese wurde auf einer Agarplatte ausgestrichen und 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert. Sobald Hefekolonien zu sehen waren, wurden mit einem sterilen Samttuch, das über einen Stempel (Größe etwas kleiner als die Agarplatte) gespannt wurde, Zellen durch vorsichtiges Aufdrücken auf die Agarplatte aufgenommen und auf eine weitere Agarplatte (mit anderen Selektionsmarkern) übertragen. Diese somit inokulierten Platten wurden ebenfalls 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Ausrichtung beider Agarplatten wurde jeweils durch eine Markierung am Rand gekennzeichnet, wodurch eine Analyse des Wachstums einzelner Kolonien unter verschiedenen Selektionsbedingungen ermöglicht wurde.

2.7 Präparation von Nukleinsäuren

2.7.1 Präparation genomischer DNA aus Hefen /Hefe-Plasmid-Präparation

(modifiziert nach Hoffmann & Winston, 1987)

3 ml aus einer Hefevorkultur (2.6.1) mit einer Zelldichte $\geq 10^7$ Zellen/ml wurden bei RT sukzessive in einen 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert (1 min bei 16000 g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 15 µl Milli-Q-Wasser resuspendiert. Es wurden 200 µl Smash and grab Lösung (Tab. 2.3), 0,3 g säuregewaschene Glasperlen (Tab. 2.3) und 200 µl Phenol-Chloroform (im Verhältnis 1:1) zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde 3 min kräftig gemischt („gevortext“). Anschließend wurde die Suspension 5-10 min mit 16000 g zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die organische Phase wurde mit 200 µl TE-Puffer (Tab. 2.3) nachextrahiert (kurz vortexen, 5-10 min mit 16000 g zentrifugieren und wässrige Phase abnehmen). Beide wässrige Phasen wurden vereinigt. Anschließend wurde optional ein RNase-Verdau eingeschoben: 5 µl RNase A (10 mg/ml in MilliQ-Wasser) wurden dabei zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Eine Phenol/Chloroform Extraktion (2.7.5) mit anschließender DNA-Fällung (2.7.6) und das Pellet anschließend mit 50 µl Milli-Q-Wasser oder TE-Puffer (Tab. 2.3) resuspendiert.

2.7.2 Plasmid Recovery

Um Plasmide aus Hefezellen zu analysieren, mussten sie isoliert werden. Deshalb wurde zunächst die Gesamt-DNA (inklusive der Plasmide) aus Hefezellen isoliert (2.7.1). Ca. 1 µg dieser DNA wurde zur Transformation von kompetenten Bakterienzellen eingesetzt (2.5.3). Aus den Bakterienzellen wurde das amplifizierte Plasmid isoliert (2.7.3) und mittels Restriktionsspaltung und Gelelektrophorese (2.7.9) analysiert.

2.7.3 Plasmid-Minipräparation aus Bakterien durch alkalische Lyse

(nach Birnboim & Doly, 1979)

Von einer Bakterienkolonie wurden 3 ml LB-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum (Tab. 2.3) inokuliert und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) bei 220 U/min inkubiert. 1,5 ml der Bakterienkultur wurden bei RT und 16000 g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 µl Lösung 1 resuspendiert (Lösung 1-3 siehe Tab. 2.3 unter Minipräparation). Durch Zugabe von 60 µl Lösung 2 wurde die Zelllyse eingeleitet. Nach vorsichtigem Mischen folgte eine Inkubation von 3 min bei RT. Anschließend wurden 70 µl Lösung 3 zugegeben, der Ansatz erneut vorsichtig gemischt und für 5 min bei 14500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl 100 % Ethanol wurden die Nukleinsäuren gefällt. Anschließend wurde der Ansatz 2 min bei 14500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 20 µl Milli-Q-Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

2.7.4 Präparation reiner Plasmid-DNA aus Bakterien

Um reine DNA (z.B. für Sequenzierungsreaktionen) zu erhalten, wurde das NucleoSpin® Plasmid Set oder für eine Midipräparation das NucleoBond® PC100 Set von Macherey und Nagel, Düren entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

2.7.5 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Die Phenol/Chloroform-Extraktion wird zur Abtrennung von Nucleinsäuren aus Protein-haltigen Lösungen eingesetzt. Zu einer DNA-Lösung wurde ein Volumen P/C (Tab. 2.3) gegeben. Der Ansatz wurde 30 s kräftig geschüttelt (nicht vortexen!) und dann 5 min bei 16000 *g* und RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.7.6 Ethanol-Fällung von DNA

Eine DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und einem 2,5fachen Volumen 100 % Ethanol versetzt. Die Lösung wurde für 15 min auf Eis inkubiert und 30 min bei 4 °C und 20000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zu dem Pellet wurden vorsichtig 500 µl 70 % Ethanol gegeben. Nach vorsichtigem Invertieren wurde der Ansatz erneut für 5 min bei 20000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20-50 µl Milli-Q-Wasser (Tab. 2.3) oder TE-Puffer (Tab. 2.3) aufgenommen.

2.7.7 Restriktionsspaltung von DNA

Die DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen erfolgte mit Enzymen der Fa. Fermentas, St. Leon-Rot unter den von den Herstellern empfohlenen Inkubationsbedingungen.

Die Aktivität von Enzymen wird in units (u) angegeben und 1 u ist definiert als die Enzymmenge, die benötigt wird, um 1 µg DNA einer Kontroll-DNA (meistens λ-DNA) in 50 µl in einer Stunde vollständig zu schneiden. Die benötigte Menge an Restriktionsenzym in units pro Ansatz wurde nach der Faustformel

$$u = \frac{\text{Länge der Kontroll - DNA}}{\text{Länge der Template - DNA}} \cdot \frac{\text{Schnittstellen in der Template - DNA}}{\text{Schnittstellen in der Kontroll - DNA}}$$

berechnet. λ -DNA hat eine Länge 48502 bp. Um eine vollständige Spaltung des Templates sicherzustellen, wurde i.d.R. das Zweifache der berechneten Enzymmenge eingesetzt. Bei Verdacht auf Verunreinigung mit RNA, z.B. bei Verwendung von Plasmid-DNA aus einer Minipräparation wurde dem Ansatz jeweils RNase A zu einer Endkonzentration von 0,14 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zugefügt.

2.7.8 Ligation von DNA

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten (Ligation) erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) unter den von den Herstellern empfohlenen Inkubationsbedingungen. Die zu ligierenden Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis (Vector-DNA/Insert) von 1/3 bei Fragmentenden mit 3'- oder 5'-Überhang („sticky ends“) oder 1/5 bei glatten Enden („blunt ends“) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde in einem zweiten Ansatz unter ansonsten gleichen Bedingungen anstelle des Inserts ein entsprechendes Volumen TAE-Puffer (Tab. 2.3) zugegeben. Mit diesem Kontrollansatz sollte die Religationsrate der Vektor-DNA bestimmt werden. Bei einer Gesamt-DNA-Menge von 50-500 ng wurden dem jeweiligen Ansatz 2-4 μl der T4-DNA-Ligase zugeführt und 1 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit konnte der Ligationsansatz unmittelbar für eine Transformation in Bakterien verwendet werden.

2.7.9 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit 0,8 %igen Agarosegelen mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid. Als Gel- und Laufpuffer wurde TAE-Puffer (Tab. 2.3) verwendet. Proben wurden im Verhältnis 1:6 mit Ladepuffer (Tab. 2.3) versetzt und als Längenstandard wurde eine GeneRuler™ 1 kb Leiter (Fermentas, St Leon-Rot) verwendet. Nukleinsäurebanden wurden nach Auftrennung durch UV-Licht (308 nm) auf einem UV-Transilluminator (Rothhaar und Schröder) sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.7.10 DNA-Elution aus Agarosegelen

Mittels Gelelektrophorese (2.7.9) wurde DNA der Größe nach aufgetrennt. Zur Abschwächung mutagenen Wirkung von UV-Licht, wurde das Agarosegel auf drei übereinander liegende, mit Ethanol gereinigte Glasplatten gelegt und durch die Glasscheiben möglichst kurz mit UV-Licht bestrahlt (UV-Transilluminator, Rothhaar und Schroeder). Während der UV-Bestrahlung wurde die DNA mit einem Ethanolgereinigtem Skalpell ausgeschnitten und in ein mit silanisierter Glaswolle (Supelco, Bellefonte, USA) befülltes, am Boden mit einer Nadel durchstochenes 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses Gefäß wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und 10 min mit 16000 *g* bei RT zentrifugiert. Die so eluierte DNA wurde entweder direkt für eine Ligationsreaktion (2.7.8) eingesetzt, einer Ethanol-Fällung (2.7.6) unterworfen oder bei 4 °C kurzzeitig gelagert.

2.7.11 Quantifizierung von DNA durch Messung der optischen Dichte

Zur Quantifizierung doppelsträngiger DNA in einer Lösung wurde die optische Dichte der Lösung bei 260 nm (OD_{260}) (Quarzküvette) in einem Photometer bestimmt. Die DNA-Konzentration wurde entsprechend der Formel

$$[DNA] \frac{\mu g}{ml} = OD_{260} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \quad \text{Gleichung 2.1}$$

berechnet. Die Reinheit der Lösung wurde durch zusätzliche Messung der optischen Dichte bei 280 nm ermittelt. Das Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} sollte etwa 1,8 betragen. Ein höherer Wert kann auf Verunreinigung durch RNA hinweisen (reine RNA weist ein OD_{260}/OD_{280} -Verhältnis von 2 auf), ein niedrigerer Wert auf Verunreinigung durch Proteine.

2.7.12 Sequenzierung von DNA

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Geneart GmbH, Regensburg, durchgeführt. Die zu sequenzierende DNA wurde unter Verwendung des NucleoSpin[®]-Plasmid-Sets von Macherey & Nagel, Düren, aus Bakterien isoliert

(2.7.4), die für die Sequenzierungsreaktion benötigten Oligonukleotide wurden von Invitrogen, Karlsruhe, generiert.

2.7.13 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Amplifikation von bestimmten DNA-Abschnitten wurde mittels PCR durchgeführt. Die dazu benötigten Oligonukleotide wurden von Invitrogen, Karlsruhe, hergestellt. Dazu wurde in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß folgender 50 µl-Ansatz pipettiert. Matrizen-DNA in Form von 0,1-0,5 µg genomischer DNA aus *S. cerevisiae* oder 100-500 ng Plasmid-DNA, aufgenommen in entsprechendem Volumen von Milli-Q-Wasser, TAQ-Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot [#EP0401]), MgCl₂ zu einer finalen Konzentration von 1,5 mM, dNTP zu einer finalen Konzentration von 0,2 mM, je 25 pmol Sinn- und Gegensinn-Primer, 1,25 u rekombinante *Taq*-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot [#EP0401]). Die Reaktionen wurden im Mastercycler personal oder Mastercycler gradient von Eppendorf, Hamburg durchgeführt.

Das Standard PCR-Programm sah wie folgt aus:

Initial-Denaturierung	3 min 94 °C
20-25 Zyklen	20 s 94 °C (Denaturierung), 50 s X* °C (Anlagerung), X** min 72 °C (Extension)]
finale Extension	3 min 72 °C.

* Die Temperatur für die Anlagerung der Primer wurde entsprechend der zur Matrizen-DNA homologen Primer-Sequenz gewählt und wurde nach folgender Formel berechnet: $X \text{ °C} = 2 * [A/T] + 4 * [G/C] - 3$. Falls bei den so errechneten Temperaturen keine ausreichende Amplifikation erreicht werden konnte, wurde die optimale Anlagerungstemperatur durch eine Gradienten-PCR ermittelt, indem ein 100 µl PCR-Reaktionsansatz auf sieben 0,2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt wurde und die PCR in einem Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg) parallel bei verschiedenen Anlagerungstemperaturen durchgeführt wurde.

** Die Dauer der Extension war abhängig von der Größe des erwarteten Amplifikationsprodukts und der Prozessivität der *Taq*-Polymerase und wurde nach folgender Formel berechnet $X \text{ min} = (\text{Fragmentlänge in bp} / 1000) + 0,15$.

PCR-Protokolle, die für die *in vitro*-Mutagenese von *HERG* verwendet wurden.

1) Herstellung von *HERG_{LGL}* (Abb. 7.2) mit dem Primerpaar RGR_LGL_S und RGR_LGL_Sacl_A (Tab. 2.6): Initial-Denaturierung und finale Extension wurden wie im Standardprotokoll beschrieben durchgeführt (siehe oben). Die PCR hatte 25 Zyklen mit jeweils 30 s bei 94 °C (Denaturierung), 40 s bei 46 °C (Anlagerung) und 55 s bei 72 °C (Extension). Erst bei Zugabe von 1x bzw. 2x Q-Solution (Qiagen, Hilden) zum PCR-Ansatz entstand ein PCR-Amplifikat.

2) Herstellung von *HERG_{LGL_FCYLENE}* (Abb. 7.3) mit dem Primerpaar herg_s6 und hERG_FCYLENE (Tab. 2.6): Initial-Denaturierung und finale Extension wurden wie im Standardprotokoll beschrieben durchgeführt (siehe oben). Die PCR hatte 20 Zyklen mit jeweils 30 s bei 94 °C (Denaturierung), 40 s bei 59 °C (Anlagerung) und 55 s bei 72 °C (Extension).

2.8 Biochemische Methoden

2.8.1 Proteinaufreinigung

(nach Silve *et al.*, 1991)

10 ml einer Hefevorkultur (2.6.1) wurden bis zu einer OD von 1 angezogen. 3 ml dieser Zellsuspension wurden für 20 sek bei 16000 *g* zentrifugiert und das Pellet in 1 ml A. dest. aufgenommen und erneut für 20 sek bei 16000 *g* zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl einer frisch angesetzten Lösung mit 1,85 M NaOH und 7 % 2-mercapto-Ethanol resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Fällung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 100 µl 50 % Trichloressigsäure (TCA) und Inkubation für 5 min auf Eis. Der Ansatz wurde für 10 min bei 12000 *g* zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und zu dem Pellet wurden 500 µl einer 1 M Tris Base Lösung zugegeben ohne die Zellen zu resuspendieren. Der Überstand wurde wieder abgenommen und das Pellet in 40 µl TBS resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden für die Proteinbestimmung nach Bradford (2.8.2) verwendet, der Rest 2:1 mit Probenpuffer (Tab. 2.3) für die SDS-PAGE (2.8.3) versetzt.

2.8.2 Proteinbestimmung nach Bradford

(nach Bradford, 1976)

10 µl einer Probe wurden mit 1 ml Bradfordreagenz (Tab. 2.3) versetzt, heftig durchmischt („gevortext“) und 10 min bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte im Photometer bei 595 nm gegen A. dest.. Eine Eichkurve wurde mit 0-100 µg/ml Rinderserumalbumin hergestellt.

2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(nach Laemmli, 1970)

SDS-PAGE wird zur Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht verwendet. Nach dem Gießen des Trenngels (Tab 2.3) in einer Gelkammer (MiniProtean Zelle von Bio-Rad, Hercules, CA/USA) wurde dieses mit 50 % Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde dessen Oberkante mit A. bidest gewaschen und anschließend mit dem Sammelgel (Tab. 2.3) überschichtet. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Auftragen der Proben und des Größenstandards wurden die Kammern mit Kathodenpuffer (0,1 M Tris; 0,1 % SDS; 0,1 M Tricin) und Anodenpuffer (0,2 M Tris/HCl pH 8,9) gefüllt. An die Anlage wurde eine Spannung von 100 V angelegt, die, sobald die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, auf 120 V erhöht wurde.

2.8.4 Anfärbung der Proteine im Gel

Nach der SDS-PAGE wurde zur Visualisierung der Proteine im Gel eine Färbung mit Serva Blue G vorgenommen. Bei dieser Färbung wurden die Proteine zunächst für 45 Minuten mit Fixierlösung (50 % Ethanol; 10 % Essigsäure) im Gel fixiert. Es folgte die Färbung mit Färbelösung (0,025 % Serva Blue G; 10 % Essigsäure), die in der Regel über Nacht, jedoch zumindest für 1 Stunde, erfolgte. Schließlich wurden die Gele mit Entfärberlösung (10 % Essigsäure) gewaschen bis der Hintergrund klar war.

2.8.5 Western-Blot

Ein Western Blot bezeichnet den Transfer (Blotten) von Proteinen auf eine Trägermembran. Der Western-Transfer wurde in einer Trans Blot Cell von Bio-Rad, Hercules/ CA durchgeführt. Der Blot wurde dabei möglichst luftblasenfrei in folgender Schichtung aufgebaut: Textilfaser, Whatman Filterpapier, SDS-Gel, Nitrocellulose-Membran (Cellulosenitrat BA 83, 0,2 µm, Amersham), Whatman Filterpapier, Textilfaser. Der Transfer erfolgte bei 4 °C und einer Spannung von 110 Volt für ca. 1,5 h. Wurde die Spannung nicht erreicht, wurde die Transferzeit entsprechende verlängert. Als Transferpuffer wurde der „Blot-Puffer“ (Tab. 2.3) verwendet. Die Membran wurde anschließend für 10 min bei 37 °C getrocknet. Für eine eventuelle Lagerung über Nacht wurde die Membran in Alufolie verpackt und bei 4 °C aufbewahrt. Die Kontrolle des Western-Blots erfolgte über eine Ponceau-Färbung.

2.8.6 Ponceau-Färbung

Die Kontrolle des Western Blots erfolgte durch die reversible Anfärbung mit Ponceau-Lösung (Tab. 2.3) Dafür wurden die Membranen 5-10 min in der Lösung bei RT schüttelnd inkubiert. Die überschüssige Farbe wurde dann mit A. dest abgewaschen. Für eine eventuell folgende Immunfärbung wurde die Membran in Streifen geschnitten, die anschließend zum Nachweis einzelner Proteine durch Antikörper eingesetzt wurden.

2.8.7 Immunfärbung

Nach der Ponceau-Färbung wurde die Nitrozellulose-Membran in Streifen geschnitten und 3-4x in PBS (Tab. 2.3) gewaschen. Das Blocken der unspezifischen Bindungen der Membran erfolgte durch Zugabe von 1 ml Blocklösung (PBS + 5 % Magermilchpulver) pro Streifen für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Die Inkubation mit dem 1:1000 verdünnten anti-GFP-Antikörper (Cat. No. 1814460, Roche) erfolgte in 0,5 ml PBS + 2,5 % Magermilchpulver für 1 h bei RT. Überschüssige Antikörper wurden durch 4x Waschen in PBST (Tab. 2.3) entfernt. Die Inkubation mit dem 1:7000 in PBST verdünnten 2. Antikörper (Alkaline Phosphatase + anti-Maus-IgG Konjugat, Sigma A-5153) erfolgte für 1h bei RT in 0,5

ml PBS + 2,5 % Magermilchpulver. Durch 3x Inkubation für 10 min bei RT in PBST wurde der 2. Antikörper abgewaschen und anschließend wurden die Ansätze noch 1x für 5 min bei RT mit TBS gewaschen. Die Färbung erfolgte durch 5-30 min Inkubation in 0,5 ml BCIP/NBT (Sigma B-6404). Nach Beendigung der Färbung wurden die Membranstreifen 10 min in A. dest. gewaschen.

2.9 Wachstumstests

2.9.1 Vorkulturen für Wachstumstests

20 µl einer Glycerinkultur wurden auf SDAP-Selektions-Agarplatten (Tab. 2.3) ausgestrichen und 3-5 Tage bei 30 °C inkubiert. Von einer Kolonie wurden 5 – 10 ml SDAP-Medium (Tab. 2.3) inokuliert und drei Tage bei 30 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit sollten die Zellen die stationäre Wachstumsphase erreicht haben.

2.9.2 Durchführung des Wachstumstests in Mikrotiterplatten

Zellsuspensionen von stationär angewachsenen Vorkulturen (2.9.1) wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen pelletiert, dann jeweils das Pellet in Milli-Q-Wasser aufgenommen, der Ansatz erneut zentrifugiert, das Pellet in SDAP-Medium (Tab. 2.3) resuspendiert (Zellsuspension 1) und die OD_{600} bestimmt. Die Zelldichte wurde mit entsprechendem SDAP-Medium an eine finale OD_{600} von 0,2 (bei Verwendung von SDAP-Medium mit AS-Mix) bzw 0,35 (bei Weglassen des AS-Mix) angepasst. Erneut wurde die OD_{600} kontrolliert und gegebenenfalls durch Zugabe von SDAP-Medium oder Zellsuspension 1 korregiert. Als Mikrotiterplatten wurden 96-Well-Platten mit klarem, flachem Boden von Greiner verwendet. Pro Kavität (Well) wurden 100 µl Zellsuspension vorgelegt sowie 3 oder 5 µl der in Milli-Q-Wasser oder DMSO gelösten Testsubstanz in entsprechender Konzentration zugegeben. Als Kontrolle dienten Ansätze mit 100 µl Medium und entsprechendem Volumen Testsubstanz. Die Platten wurden mit Deckel verschlossen und durch Parafilm-M (Brand, Wertheim) abgedichtet. Die Dokumentation des Wachstums erfolgte durch Mikrotiterplattenlesegeräte (SpectraFluor Plus oder Genios von TECAN, Crailsheim) unter Verwendung der Magellan- oder Amphis-Software (TECAN, Crailsheim). Dabei wurden die Platten für bis zu 20 Stunden bei 30 °C inkubiert, in Intervallen von 15

min wurde die OD_{600} gemessen und zwischen den jeweiligen Messungen wurden die Platten geschüttelt. Die erhaltenen Daten wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel exportiert und dort ausgewertet.

2.9.3 Auswertung von Wachstumstests

Eine Charakterisierung des Wachstums erfolgte durch eine Approximation der Fläche („Integral“) unter der Wachstumskurve W_{integral} (Einheit: $OD_{600} \cdot h$) während 12,5 Stunden Inkubation durch die folgende Gleichung (nach Hasenbrink *et al.*, 2005)

$$W_{\text{integral}} = \sum_{i=1}^{m-1} \left[\left(\frac{1}{2} (OD_i + OD_{i+1}) - OD_1 \right) \cdot (t_{i+1} - t_i) \right] \quad \text{Gleichung 2.2}$$

wobei OD_i die gemessene optische Dichte, t_i die Zeit nach Teststart t_0 in h und $i = 1$ bis m die Anzahl der Messungen während der Testdauer von 12,5 h ist.

Inhibitorische oder stimulierende Effekte von Testsubstanzen auf das Wachstum der Teststämme wurden durch Ermittlung der EC_{50} (effektive Konzentration der jeweiligen Testsubstanz, bei der 50 % des maximalen Effekts beobachtet werden) quantifiziert. Entsprechende EC_{50} -Werte wurden bestimmt, indem Parameter für Gleichungen zur Beschreibung der beobachtenden Effekte abgeschätzt wurden. Für monophasische Effekte wurde die Hillgleichung

$$y(\log(x)) = b + \frac{(a - b)}{1 + 10^{(LEC50 - (\log(x)) \cdot h)}} \quad \text{Gleichung 2.3}$$

mit Hilfe eines in „R“ (The R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project>) geschriebenen Programms von J. Ludwig an die entsprechenden Datenpunkte approximiert. a und b stehen hierbei für den oberen und unteren Grenzwert der Hillfunktion, x für den Zahlenwert der Testsubstanzkonzentration, $LEC50$ für den dekadischen Logarithmus des EC_{50} -Wertes und h für den Hill-Koeffizienten. Dosis-Wirkungs-Kurven, die auf der Inhibierung des heterologen K^+ -Kanals mKir2.1 beruhten, wurden von zytotoxischen Effekten durch Subtraktion der Dosis-Wirkungs-Kurven des Kontrollstammes (ohne mKir2.1) vom Teststamm (mit mKir2.1) isoliert.

Für die Beschreibung biphasischer Effekte auf das Wachstum wurde darüber hinaus die Gleichung

$$G = G_{start} \cdot \left[1 - \left((1 - E_1) \cdot \frac{c^n}{K_1 + c^n} \right) \right] \cdot \left[1 - \left((1 - E_2) \cdot \frac{c^m}{K_2 + c^m} \right) \right] \quad \text{Gleichung 2.4}$$

nach Hasenbrink *et al.* (2005) verwendet. c steht hierbei für die Zahlenwerte der Testsubstanzkonzentrationen, n und m für die Kooperativität des jeweiligen Effekts, G für das nach Gleichung 2.2 berechnete Wachstum bei Konzentration c , G_{start} für das Wachstum ohne Zugabe der Testsubstanz (negative Kulturkontrolle), $E_{1,2}$ für das Wachstum bei maximalem Wachstumseffekt relativ zur negativen Kulturkontrolle, $K_{1,2}$ für die Zahlenwerte der Halbsättigungskonstante (analog zum K_M -Wert in der Michaelis-Menten-Gleichung). Die Indizes bei $E_{1,2}$ und $K_{1,2}$ kennzeichnen die Zugehörigkeit zu jeweils einem von zwei zu beobachtenden Effekten auf das Wachstum (Effekt durch Inhibierung von mKir2.1 und zytotoxischer Effekt).

2.10 Mikroskopie

Für die lichtmikroskopische Untersuchung von Zellsuspensionen wurde ein Lichtmikroskop BH-2 (Olympus, Hamburg) verwendet. Neben der Prüfung auf mögliche Kontaminationen in Medien und Zellsuspensionen, war im Wesentlichen der Zustand der Zellen Ziel der mikroskopischen Untersuchung. Gesunde exponentiell wachsende Zellen wiesen in der Regel glatte Zelloberflächen und zu über 70 % Knospen auf. Bei stationären Zellen ist der Anteil der knospenden Zellen deutlich geringer und die Zellen neigen dazu zu verklumpen.

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurde ein ZEISS Axioplan Mikroskop (ZEISS, Jena) mit einem Zeiss Plan Neofluar 100x Objektiv verwendet. Anregungsquelle war eine 50 W Hg Dampfstrahler-Lampe. GFP Fluoreszenz wurde durch einen 450-490 nm Bandpass-Exitationsfilter und einen 515–565 nm Bandpass-Emissionsfilter, Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich (bei Färbung mit Alexa Fluor[®] 594 oder FM4-64, 2.11.2 bzw. 2.11.3) durch einen 555-570 nm Bandpass-Exitations-Filter und einen 580–625 nm Bandpass-Emissionsfilter und Fluoreszenz im blauen Wellenlängenbereich (bei Färbung mit Filipin, 2.11.1) durch einen „BP

365/12“ Bandpass-Excitations-Filter und einen „LP 397“ Langpass-Emissionsfilter visualisiert. Die Bilder wurden mit einer CCD Kamera (CF8/ DXC, Kappa, Gleichen) aufgenommen.

Zur Immobilisierung der Zellen auf dem Objektträger wurde die Zellsuspension 1:1 mit ca. 40 °C warmer 1 % (w/v) niedrig-Schmelztemperatur-Agarose (SeaPlaque GTG Agarose, FMC) vermischt. Von dieser Suspension wurden 5 µl auf den Objektträger gegeben und mit einem Deckglas (18 x 18 mm) zugedeckt.

2.11 Anfärbung von Bestandteilen der Plasmamembran

Anzufärbende Hefezellen wurden über Nacht in SDAP-Medium, pH 5,9 mit 50 mM KCl bei 30 °C angezogen.

2.11.1 Anfärbung von Ergosterol mit Filipin (Sigma F-9765)

Zunächst wurde eine Filipin-Stammlösung (25 mg/ml in DMSO, dunkel gehalten) hergestellt. Nach Inkubation der Zellen (s.o.) wurde der Zellsuspension 50 µg/ml Filipin zugegeben und 2 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen pelletiert und wieder in SDAP-Medium resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Filipin-Fluoreszenz im Vergleich mit GFP-Fluoreszenz, siehe 2.10). Zu bedenken war, dass Filipin-Fluoreszenz nach wenigen Sekunden ausbleicht.

2.11.2 Anfärbung von GM1-Gangliosiden mit Vybrant® Alexa Fluor® 594 Lipid Rafts Labeling Kit

(Molecular Probes, V34405)

Zunächst wurden eine Stammlösungen von Cholera Toxin Untereinheit B (CT-B) gekoppeltem Alexa Fluor® 594 (1 mg/ml in 1 x PBS) hergestellt und auf -20 °C gelagert. Nach Inkubation der Zellen (s.o.) wurde der Zellsuspension CT-B-Alexa Fluor® 594 Stammlösung zu einer finalen Konzentration von 6 µg/ml zugegeben und 20 min bei RT (nach Ayllon *et al.*, 2002) inkubiert. Danach wurden die Zellen pelletiert und wieder in SDAP-Medium resuspendiert. Anschließend wurde der

Ansatz fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Alexa Fluor[®] 594-Fluoreszenz im Vergleich mit GFP-Fluoreszenz, siehe 2.10).

2.11.3 Anfärbung mit FM 4-64

(modifiziert nach Vida & Emr, 1995)

FM 4-64 (Invitrogen, T-13320) wurde in Milli-Q-Wasser gelöst und eine 1,6 mM Stammlösung hergestellt (Lagerung bei -20 °C). Alle folgenden Schritte wurden auf Eis gekühlt. Nach Inkubation der Zellen (s.o.) wurde zu der Zellsuspension FM 4-64 zu einer finalen Konzentration von $20\text{ }\mu\text{M}$ zugegeben und der Ansatz für 45 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und in frischem auf Eis gekühltem SDAP-Medium aufgenommen. Der (immer noch auf Eis gekühlte) Ansatz wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht (FM 4-64-Fluoreszenz im Vergleich mit GFP-Fluoreszenz, siehe 2.10). Dabei war auf eine zügige Arbeitsweise zu achten, da voraussichtlich die Wärmeentwicklung unter dem Mikroskop nach 1 bis 2 min zu einer Internalisierung des Farbstoffes führte.

3 Ergebnisse

Die hier in Hefe exprimierten und untersuchten Säuger-Kaliumkanalgene sind *HERG* aus *H. sapiens* und *mKir2.1* aus *M. musculus*. Im Folgenden werden Untersuchungen zur Charakterisierung beider Kanalgene in *S. cerevisiae* K⁺-Aufnahme-Mutanten vorgestellt.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme und weitere Verweise zu deren Herkunft oder Konstruktion sind unter 2.1.1 aufgeführt.

3.1 Untersuchungen zur funktionellen Expression des humanen ERG-Kanals in K⁺-Aufnahme-Mutanten von *S. cerevisiae*

3.1.1 Lokalisation von hERG

Ein Kennzeichen einer funktionellen Expression des K⁺-Kanals hERG ist die korrekte Integration in die Plasmamembran. Die Untersuchung hierzu erfolgte über die Expression von Fusionskonstrukten aus *HERG*- und *yeGFP*-DNA. *yeGFP*, im Folgenden als „GFP“ bezeichnet, ist eine für die Expression in Hefe modifizierte Variante des GFP-Proteins aus *Aequorea victoria* (Cormack *et al.*, 1996). *yeGFP*-Fusionsproteine wurden mittels Fluoreszenz-mikroskopie lokalisiert. Wie in Abb. 3.1 zu sehen, zeigten die Hefen bei chromosomaler Expression von *HERG-GFP* (bei Integration in den *LEU*-Lokus in $\Delta trk1,2$ - und $\Delta trk1,2, \Delta tok1$ -Mutanten (Abb. 3.1 A und B) bzw. Integration in den *TOK1*-Lokus in der $\Delta trk1,2$ -Mutante (Abb. 3.1 C)) ein punktförmiges GFP-Fluoreszenzmuster im Inneren der Zellen. Bei episomaler Expression von *HERG-GFP* (pYEX-Plasmid) in der $\Delta trk1,2, \Delta tok1$ -Mutante erstreckte sich die GFP-Fluoreszenz über größerflächige, zuweilen bananenförmige intrazelluläre Strukturen (Abb. 3.1 D).

Zur Untersuchung möglicher Ursachen dieser intrazellulären Retention wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Unter dem Aspekt, dass das C-terminal gebundene GFP zu einer Demaskierung eines potentiellen ER-Retentionssignals in hERG und damit zu einer Retardierung des Proteins im ER, gefolgt von der Degradation in Proteasomen, führen könnte, wurde das GFP-Fluorophor an das N-terminale Ende von hERG fusioniert. Auch hier zeigten die Fluoreszenzaufnahmen eine Lokalisation in intrazellulären Kompartimenten (Abb. 3.1 G und H).

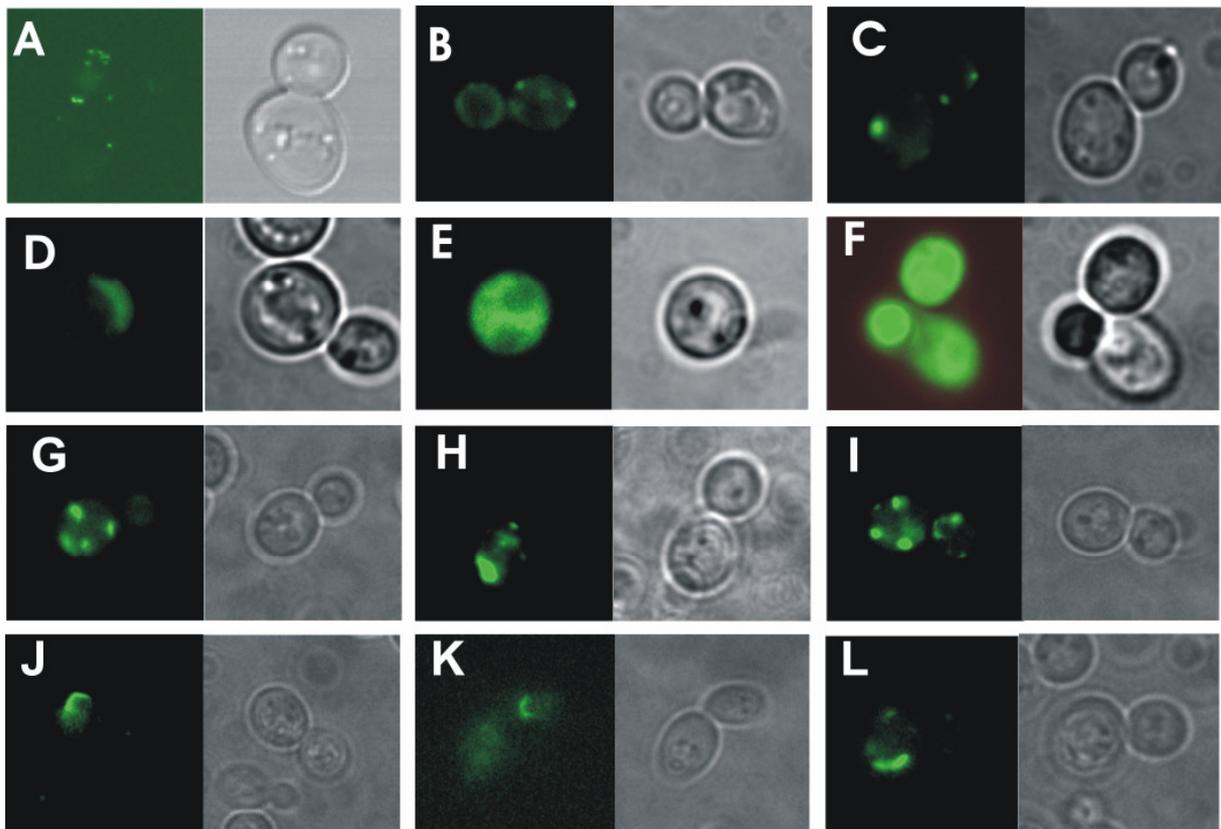


Abb. 3.1: Lokalisation von GFP-hERG-Fusionsproteinen aus wt hERG bzw. hERG-Mutanten und entsprechenden Kontrollen (nur GFP) in $\Delta trk1,2$ oder $\Delta trk1,2, \Delta tok1$ -Zellen. A-D: GFP-Fluoreszenzverteilung bei C-terminal fusioniertem GFP: PLY240L-HERG-GFP (A), PLY246L-HERG-GFP (B) PLY240T-HERG-GFP (C) PLY246 [pYEX-HERG-GFP] (D) zeigen punkt- oder bananenförmige Lokalisation im Zellinneren. E, F: Entsprechende Kontrollen: PLY240T-GFP (E) und PLY246 [pYEX-GFP] (F). G-L: GFP-Fluoreszenzverteilung bei N-terminal fusioniertem GFP: PLY240 [pYEX-GFP-HERG] (G), PLY246 [pYEX-GFP-HERG] (H), nach Austausch des ER-Retentionssignals in *HERG* ($HERG_{LGL}$): PLY240 [pYEX-GFP-HERG_{LGL}] (I) PLY246 [pYEX-GFP-HERG_{LGL}]. (J), nach Anhängen eines ER-Exportsignals an $HERG_{LGL}$ ($HERG_{LGL-FCYENE}$): PLY240 [pYEX-GFP-HERG_{LGL-FCYENE}] (K) PLY246 [pYEX-GFP-HERG_{LGL-FCYENE}] (L).

Kupershmidt *et al.*, (2002) konnten in *Xenopus* Oocyten zeigen, dass im hERG-Protein an den Positionen 1005-1007 ein ER-Retentionssignal codiert ist, welches bei korrekter Faltung von hERG durch Sequenzen am C-Terminus maskiert wird. Erst durch die Maskierung dieses ER-Retentionssignals wurden ein anterograde Weitertransport aus dem ER zur Plasmamembran ermöglicht und für hERG typische I_{Kr} -Ströme beobachtet. Durch Austausch der Aminosäuren RGR gegen LGL an den Positionen 1005-1007 konnte das ER-Retentionssignal disruptiert und ein Weitertransport in anterograde Richtung auch ohne die korrekte Faltung des C-Terminus gewährleistet werden. Eine entsprechende Disruption dieses potentiellen

ER-Retentionssignals in hERG (hERG_{LGL}) bewirkte bei der Expression in Hefe allerdings ebenfalls keine Lokalisation in der Plasmamembran (Abb. 3.1 I und J).

Ein weiterer Ansatz folgte der von Ma *et al.*, (2001) beschriebenen Strategie: Durch C-terminale Fusion eines ER-Exportsignals aus den Aminosäuren FCYENE an Kaliumkanäle und ER residente G-Protein gekoppelte Rezeptoren konnte deren Anteil an der Zelloberfläche deutlich erhöht werden; allerdings nur, wenn auch deren ER-Retentionssignal disruptiert war. Daher wurde an das *GFP-HERG_{LGL}*-Konstrukt die Sequenz für das Exportsignal FCYENE C-terminal fusioniert. Wie in Abb. 3.1 K und L zu erkennen ist, führte diese Modifikation im Fluoreszenzbild bei Expression in der Hefe zu keiner erkennbaren Plasmamembranlokalisation.

Darüber hinaus wurde untersucht, inwieweit durch die Applikation einiger, als chemische Chaperone bekannter niedermolekularer Substanzen (zur Übersicht siehe 1.5), die Oberflächendichte von hERG erhöht werden konnte. Im PLY240 Hefemodell führte die Applikation von 5, 10 und 15 % Glycerol, 50 mM Glutamin oder 2 % DMSO bei pH 5.9 bzw pH 7.0 zu keiner signifikanten Veränderung der Lokalisation der hERG-Varianten hERG-GFP, GFP-hERG, GFP-hERG_{LGL} und GFP-hERG_{LGL}_{FCYENE} gegenüber unbehandelten Zellen (ohne Abbildung).

3.1.2 Untersuchung zu einem hERG-spezifischen Wachstumsphänotyp

Obwohl hERG-GFP Fusionsproteine durch Fluoreszenzmikroskopie nicht in der Plasmamembran lokalisiert werden konnten, wäre es möglich, dass einzelne Kanalproteine die Plasmamembran erreichen. So wurde untersucht, inwieweit durch Expression der *GFP*-fusionierten *HERG*-Varianten in *S. cerevisiae* K⁺-Aufnahmemutanten ($\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$) eine Komplementation des mutanten Wachstumsphänotyps bei limitierenden K⁺-Konzentrationen erreicht werden konnte. Durch Expression der *HERG*-Varianten in der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ Dreifachmutante konnte jedoch bei steigenden KCl-Konzentrationen keine Verbesserung des mutanten Wachstumsphänotyps beobachtet werden (Abb. 3.2). Bei Expression von *HERG* ohne *GFP*-Fluorophor in *S. cerevisiae* $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ (PLY246T-HERG) konnte ebenfalls keine deutliche Verbesserung des Wachstums bei limitierenden K⁺-Konzentrationen (10 mM KCl) gegenüber der Kontrolle ohne *HERG* (PLY246L-GFP) festgestellt werden (ohne Abbildung). Die jeweiligen, hier für die Untersuchung der Expression von *HERG* verwendeten Kontrollstämme ohne *HERG* PLY246L-GFP,

PLY240T-GFP und PLY246 [pYEX-GFP] zeigten, ebenso wie die Ausgangsstämme PLY240 und PLY246, bei limitierenden K^+ -Konzentrationen (10 mM KCl) ein vergleichbar geringes Wachstum (ohne Abbildung).

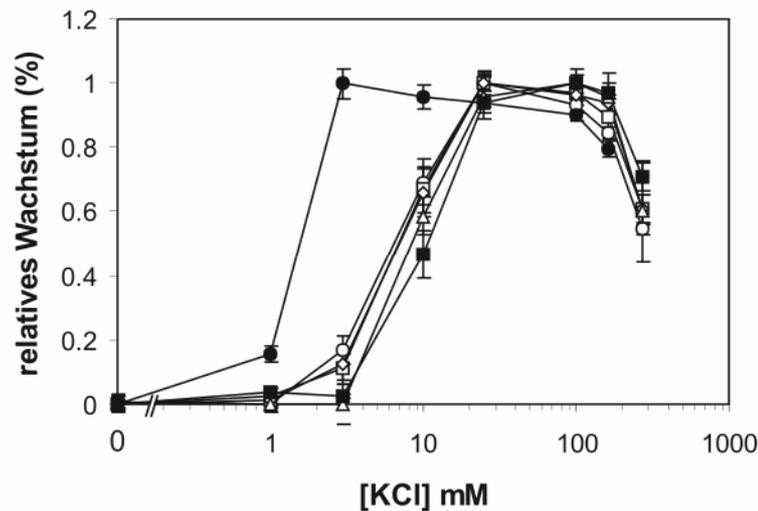


Abb. 3.2: Einfluss steigender KCl-Konzentrationen auf das Wachstum *HERG* exprimierender Stämme. Die GFP exprimierende $\Delta trk1,2, \Delta tok1$ Dreifachmutante PLY246 [pYEX-GFP] (■) weist bei niedrigen K^+ -Konzentrationen gegenüber dem Wildtyp PLY232 (●) einen eindeutigen Wachstumsdefekt auf. Die Expression von Varianten eines Fusionsproteins aus hERG und GFP in der $\Delta trk1,2, \Delta tok1$ Mutante PLY246L-HERG-GFP (○), PLY246 [pYEX-HERG-GFP] (□), PLY246 [pYEX-GFP-HERG] (◇), PLY246 [pYEX-GFP-HERG_{LGL FCYENE}] (△) führte zu keiner Veränderung der Dosis-Wirkungs-Kurve gegenüber der Kontrolle (■). Das relative Wachstum (ermittelt nach der Integral-Methode 2.9.3) wurde bei pH 5,9 in MES gepuffertem Medium ermittelt. Fehlerbalken repräsentieren jeweils den Standardfehler aus drei unabhängigen Tests.

3.2 Untersuchungen zur funktionellen Expression des murinen Kir2.1-Kanals in *S. cerevisiae* K^+ -Aufnahme-Mutanten

3.2.1 Lokalisation von mKir2.1

Mit Hilfe von mKir2.1-GFP-Fusionskonstrukten konnte anhand der GFP-Fluoreszenz das Fusionsprotein in $\Delta trk1,2$ bzw. $\Delta trk1,2, \Delta tok1$ -Mutanten um ein Zellkompartiment (wahrscheinlich der Zellkern) und in der Nähe der Plasmamembran lokalisiert werden (Hasenbrink *et al.*, 2005; Abb. 3.3). Die Lokalisation von GFP-mKir2.1 an der Zellperipherie war hierbei nicht von der Lokalisation der Fusionsproteine GFP-Trk1 und -Trk2 (Trk1 und 2: endogene Plasmamembrantransporter, siehe 1.3) zu unterscheiden (Abb. 3.3 C,D), zeigte jedoch auch Überlappungen mit einem

konstruierten „ER-Marker“-Protein Abb. 3.3 E). Als „ER-Marker“ (sig/mRFP/HDEL) wurde monomeres „red fluorescent protein“ (mRFP, Campbell *et al.*, 2002) N-terminal mit der Signalsequenz des Prepro- α -Faktors pp α F (sig) (Plath *et al.*, 2004) und C-terminal mit dem ER-Retentionssignal HDEL (Pelham, 1995) fusioniert (Hasenbrink *et al.*, 2005; Schwarzer, 2006).

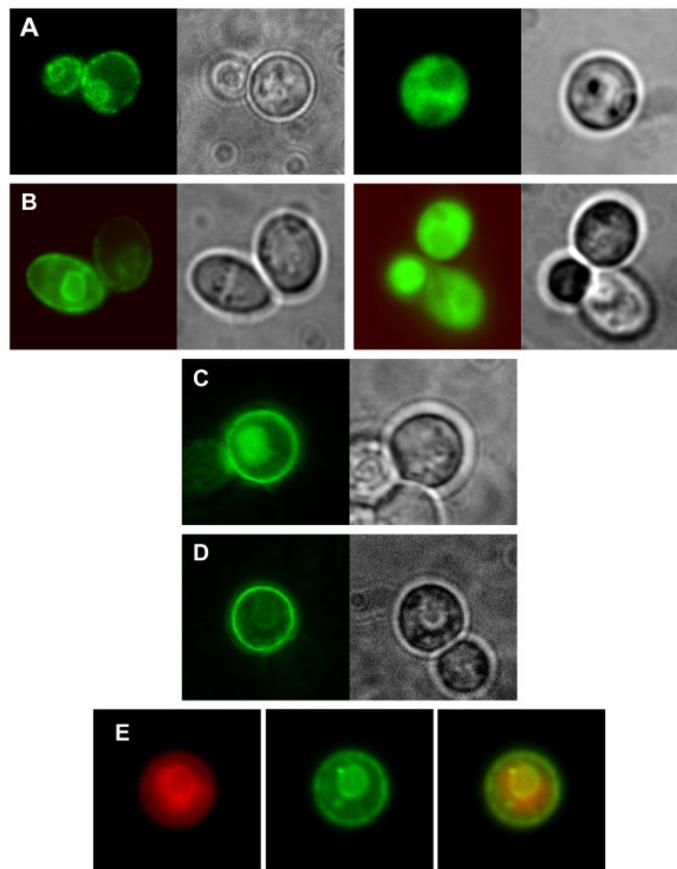


Abb. 3.3: Lokalisation von GFP-fusioniertem mKir2.1 im Vergleich zu den GFP-fusionierten endogenen Plasmamembranproteinen Trk1 und Trk2, ER-Markern und entsprechenden Kontrollen (nur GFP). A,B, jeweils linke Bilder: *GFP-mKir2.1* exprimierende K^+ -Aufnahme defekte Stämme wiesen GFP-Fluoreszenz um eine Zellorganelle (wahrscheinlich Nukleus) sowie in der Nähe oder in der Plasmamembran auf. Die Plasmamembran-nahe Fluoreszenz war bei chromosomaler Expression von *mKir2.1* (*S. cerevisiae* PLY240T-GFP-Kir2.1) punktförmig (A, linkes Bild) und bei episomaler Expression von *mKir2.1* (PLY240 [pYEx-GFP-mKir2.1]) nahezu ringförmig (B, linkes Bild) verteilt. Entsprechende nur *GFP* exprimierende Kontrollen PLY240T-GFP (A, rechtes Bild) und PLY240 [pYEx-GFP] (B, rechtes Bild) wiesen eine zytosolische Fluoreszenzverteilung auf, letzterer Stamm mit höherer Intensität. $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Zellen, die episomal *GFP-TRK1* (PLY246 [pYEx-GFP-TRK1]; C) oder *GFP-TRK2* (PLY246 [pYEx-GFP-TRK2]; D) exprimierten, zeigten eine ringförmige Fluoreszenz in der Nähe der Plasmamembran. (E) $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Zellen, die sig/mRFP/HDEL (linkes Bild) wie auch episomal *GFP-mKir2.1* exprimieren (mittleres Bild) zeigten bei Überlagerung beider Bilder eine starke Überlappung der Fluoreszenz um eine Zellorganelle (wahrscheinlich Nukleus) sowie eine schwache ringförmige Überlappung in Plasmamembrannähe (Bilderserie E ist von S. Schwarzer).

Entsprechende, lediglich *GFP* exprimierende Kontrollzellen zeigten eine gleichmäßige zytosolische Fluoreszenzverteilung.

Mittels immuno-Western-Blot wurde darüber hinaus nachgewiesen, dass in der *GFP-mKir2.1* exprimierenden $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Dreifachmutante der Großteil des Fusionsproteins in voller Länge und somit ungespalten vorliegt. Dieser Nachweis wurde für den gleichen Stamm auch an protoplastierten Zellen erbracht (Abb. 3.4).

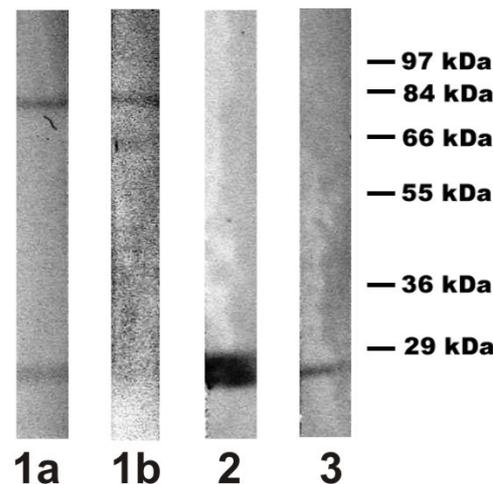


Abb. 3.4: Immuno-Blot-Analyse mit anti-GFP-Antikörpern von Proteinextrakten der *GFP-mKir2.1* exprimierenden $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Dreifachmutante (PLY240T-GFP-mKir2.1) aus normalen (**1a**) und protoplastierten Zellen (**1b**), der *GFP* exprimierenden $\Delta trk1,2$ -Doppelmutante (PLY240 [pYEx-GFP]; **2**) und der $\Delta trk1,2$ -Doppelmutante (PLY240; **3**). Die 75 kDa-Bande in Bahn 1 entspricht der Größe des GFP-mKir2.1-Fusionsproteins. Unterhalb von 29 kDa war neben der dem GFP-Protein entsprechenden Bande von 27 kDa (siehe Bahn 2) eine weitere unspezifische Bande zu erkennen, die allerdings in **1b** kaum zu erkennen ist (modifiziert nach Hasenbrink *et al.*, 2005).

3.2.1.1 Kann mKir2.1 in „Lipid-Flößen“ (Lipid Rafts) lokalisiert werden?

Um zu untersuchen, ob Kir2.1 in Lipid Rafts organisiert ist, wurden zwei Ansätze verfolgt: Anfärbung von Bestandteilen der Lipid Rafts mit Fluoreszenzfarbstoffen (3.2.1.1.1) und die Applikation von Effektoren der Lipid Rafts-Zusammensetzung (3.2.1.1.2).

3.2.1.1.1 Anfärbung von Lipid-Rafts

Die B-Untereinheit des Cholera Toxins (CT-B) bindet als Pentamer an GM1 Glycosphingolipide und ist einer der am häufigsten verwendeten Marker für Lipid Rafts (Nichols, 2003). Wie in Abb. 3.5 Aa gezeigt, konnte in der *GFP-mKir2.1*

exprimierenden $\Delta trk1,2$ -Mutante nach Anfärbung mit CT-B Alexa Fluor[®] 594 kein spezifisches Fluoreszenzsignal detektiert werden. Lediglich in ganz seltenen Fällen (etwa jede 1000ste Zelle) konnte rund um die Zelle ringförmige Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich beobachtet werden, die zwar Überlappungen mit der in der Zellperipherie lokalisierten GFP-Fluoreszenz aufwies, aber auch einen weiter außen liegenden Bereich der Zelle anfärbte (Abb. 3.5 Ab). Um auszuschließen, dass der Fluoreszenzfarbstoff die Hefezellwand nicht durchdringen kann und somit sein Zielmolekül in der Plasmamembran nicht erreicht, wurde dieselbe Färbung auch an Protoplasten untersucht. Auch hier kam es zu keiner Anfärbung der Hefezellen (Abb. 3.5 Ac).

Bagnat & Simons (2002) verwendeten Filipin als Fluoreszenzmarker zur Visualisierung sterolreicher Membrandomänen in *S. cerevisiae*. Ergosterol ist in *S. cerevisiae* das vorwiegende Sterol. Da Ergosterol in Lipid Rafts von *S. cerevisiae* angereichert ist, wurde durch die Anfärbung mit Filipin versucht, Lipid Rafts in dem o. g. Stamm zu lokalisieren. Diese Markierung führte in den meisten Zellen zu einem nahezu ununterbrochenen ringförmigen Fluoreszenzmuster in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran (Abb. 3.5 B). Dabei gab es Anzeichen einer Überlagerung von GFP-Fluoreszenz und Filipin-spezifischer Fluoreszenz rund um die Zelle.

Der Hefestamm wurde ebenfalls mit dem Fluoreszenz-Farbstoff FM 4-64 untersucht. FM 4-64 färbt in Hefe zunächst die Plasmamembran, dann zytoplasmatische Kompartimente und schließlich die vakuoläre Membran, ein Prozess, der Energie- und Temperatur-abhängig ist. Bei 0 °C wurde dagegen primär die Plasmamembran angefärbt (Vida & Emr, 1995). Das Fluoreszenzbild von mit FM 4-64 angefärbten Zellen zeigte neben einem nur schwach ausgeprägten Signal am Rande der Zelle auch Anfärbung von Zellkompartimenten im Zellinneren (Abb. 3.5 C). Eine leichte Überlagerung mit der GFP-Fluoreszenz war in der Nähe der Plasmamembran zu erkennen.

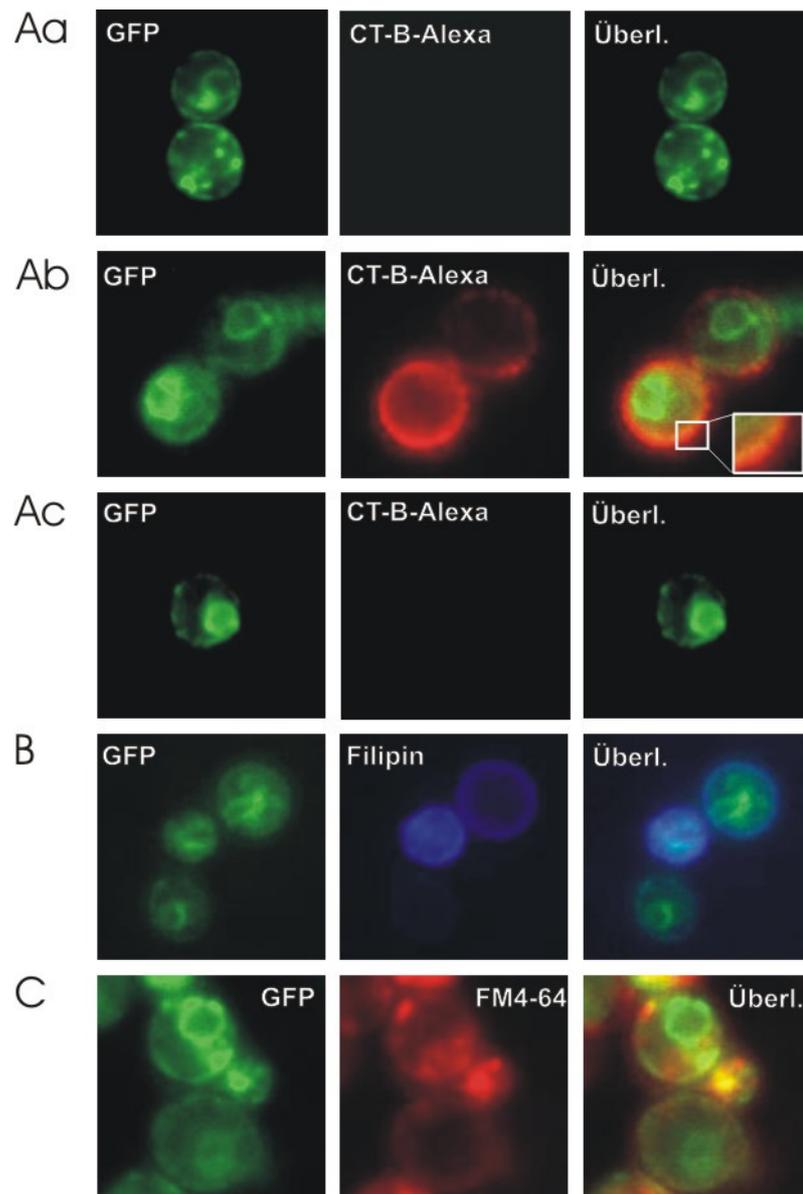


Abb. 3.5: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zur Lokalisation von mKir2.1 und Lipid Rafts in *S. cerevisiae* $\Delta trk1,2$ -Mutanten (PLY240 [pYEx-GFP-mKir2.1]). Die linke Spalte zeigt jeweils die GFP-Fluoreszenz, die mittlere Spalte die Substanz-spezifische Fluoreszenz nach Anfärbung mit Fluoreszenz-Markern und die rechte Spalte die Überlagerung beider Fluoreszenzbilder einer Zeile. Aa-Ac: Anfärbung mit dem Lipid Rafts-Marker Cholera Toxin B Alexa Fluor[®] 594 (λ_{EX} : 555-570, λ_{EM} : 580-625 nm). Fast keine Zellen zeigten ein rotes Fluoreszenzsignal (**Aa**). Nur bei etwa einer unter 1000 Zellen war ein rotes Fluoreszenzsignal in der Zellperipherie zu beobachten (**Ab**). Die Ausschnittsvergrößerung bei der Bildüberlagerung in **Ab** deutet darauf hin, dass ein Teil der CT-B Alexa Fluor[®] 594-Fluoreszenz in den Zellen weiter aussen lokalisiert ist als die GFP-Fluoreszenz. **Ac**: Gleiche Untersuchung wie in **Aa** und **Ab** mit protoplastierten Zellen. **B**: Anfärbung mit Filipin (λ_{EX} : 353-377 nm λ_{EM} : \geq 397 nm). **C**: Anfärbung mit FM 4-64 (λ_{EX} : 555-570, λ_{EM} : 580-625 nm); Zellsuspensionen wurden hierfür bis zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung auf Eis gelagert.

3.2.1.1.2 Modulatoren von Lipid Rafts

Um zu testen, inwieweit eine Veränderung der Lipidzusammensetzung der Plasmamembran Einfluss auf den möglicherweise in Membrandomänen lokalisierten Kanal mKir2.1 hat, wurde der Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) auf das Wachstum der *mKir2.1* exprimierenden Zellen untersucht. M β CD ist ein lösliches zyklisches Oligosaccharid, das bei Zugabe zu intakten Hefe-Zellen Ergosterol aus der äußeren Schicht der Plasmamembran extrahieren kann (Steck *et al.*, 2002; Baumann *et al.*, 2005). Pike & Miller (1998) sowie Gomez-Mouton *et al.* (2001) konnten zeigen, dass in Säugerzellen durch Applikation von 5 mM M β CD einige Proteine, die normalerweise in Lipid Rafts angereichert sind, delokalisiert werden konnten und sich vermehrt auf andere Membranregionen verteilten, sowie in Funktion und Aktivität beeinträchtigt waren. Durch eine analoge Veränderung der mKir2.1-Lokalisierung könnte dessen Funktion und damit das mKir2.1 vermittelte Wachstum moduliert werden. Die Zugabe von 0,1 bis 50 mM M β CD führten bei der *mKir2.1* exprimierenden $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Dreifachmutante zu keiner Inhibition des mKir2.1 vermittelten Wachstums (Abb. 3.6). Zugabe von 0,1 bis 10 mM des strukturell ähnlichen Carboxymethyl- β -Cyclodextrin (CM β CD) führten ebenfalls zu keiner Inhibition des mKir2.1 vermittelten Wachstums (ohne Abbildung).

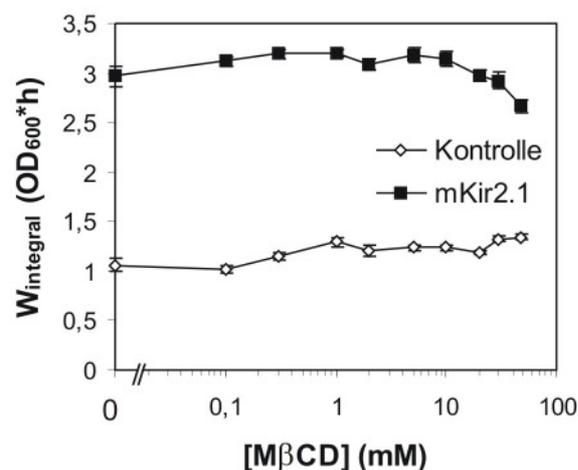


Abb. 3.6: Effekt von Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) auf das Wachstum. Dargestellt ist jeweils das Wachstum der *mKir2.1* exprimierenden $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante (PLY240T-GFP-mKir2.1, ■) und des entsprechenden Kontrollstammes ohne mKir2.1 (PLY240T-GFP, ◇). Das Wachstum W_{Integral} wurde mit der Integralmethode (2.9.3) ermittelt. Fehlerbalken representieren den Standardfehler aus vier Einzeltests.

3.2.2 Die Expression von *mKir2.1* in der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante verringert die Empfindlichkeit gegenüber Hygromycin B unter nicht-permissiven K^+ -Konzentrationen

Zur Untersuchung der Funktionalität von *mKir2.1* in *S. cerevisiae* K^+ -Aufnahme-Mutanten wurde die Veränderung der Empfindlichkeit der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante gegenüber Hygromycin B bei Expression von *mKir2.1* bestimmt. Hygromycin B ist ein Aminoglykosid Antibiotikum aus *Streptomyces hygroscopicus*, das bei Bakterien, Pilzen und höheren Eukaryoten durch Inhibierung der Proteinbiosynthese toxisch wirkt. Die Empfindlichkeit gegenüber der positiv geladenen Substanz kann als Indikator für das Membranpotential genutzt werden (Perlin *et al.*, 1988). Die Disruption und Deletion beider Trk-Transporter in *S. cerevisiae* resultierte nach Madrid *et al.* (1998) in einer Hyperpolarisation der Plasmamembran. Die Expression des einwärtsgerichtenden K^+ -Kanals *mKir2.1* in der *S. cerevisiae* $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ - K^+ -Aufnahme-Mutante könnte das Membranpotential durch einen Einwärtsstrom positiver Ladungen hin zu weniger negativen Werten verändern. $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Zellen (PLY240T-GFP) wiesen erwartungsgemäß eine relativ hohe Empfindlichkeit gegenüber Hygromycin B mit einer EC_{50} von 2,6 μM auf (Hasenbrink *et al.*, 2005; Abb. 3.7). Die Expression von *mKir2.1* in der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante (PLY240T-GFP-*mKir2.1*) führte zu einer 7-fachen Abnahme der Sensitivität mit einer EC_{50} von 15,4 μM . Ein Stamm, der die endogenen Trk1- und Trk2- K^+ -Transporter exprimiert und den K^+ -Kanal Tok1 disruptiert hat (PLY238), wurde aufgrund des funktionierenden endogenen K^+ -Aufnahmesystems als Positivkontrolle verwendet und wies die geringste Empfindlichkeit gegenüber Hygromycin B (EC_{50} : 59,7 μM) auf. Somit konnte gezeigt werden, dass die Expression von *mKir2.1* den mutanten $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Phänotyp durch eine Empfindlichkeitsabnahme gegenüber Hygromycin B komplementiert.

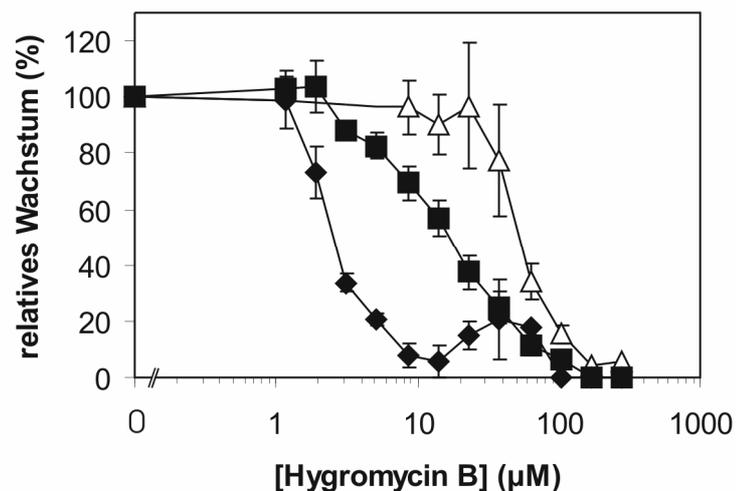


Abb. 3.7: Effekt von Hygromycin B auf das Wachstum von *S. cerevisiae*-Zellen unter nicht-permissiven Bedingungen (20 mM KCl): $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1::GFP-mKir2.1$ Zellen (■) wiesen eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber Hygromycin B auf als entsprechende Kontrollzellen ($\Delta trk1,2$, $tok1::GFP$, ♦). Die Expression der endogenen Transporter Trk1 und Trk2 (*TRK1*, *TRK2*, $\Delta tok1$, △) resultierte in einer noch geringeren Sensitivität gegenüber dem toxisch wirkenden Antibiotikum. Zellen wurden in ungepuffertem SDAP-Medium, pH 5.9 mit 20 mM KCl angezogen und das Wachstum über die Integralmethode (2.9.3) bestimmt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus mindestens 3 unabhängigen Tests dar (nach Hasenbrink *et al.*, 2005).

3.2.3 mKir2.1 spezifischer Wachstumsphänotyp

Ein weiterer bekannter Phänotyp von $\Delta trk1,2$ - und $\Delta trk1,2, \Delta tok1$ -Mutanten ist die Sensitivität gegenüber einem sauren extrazellulärem pH, insbesondere in Verbindung mit limitierenden Kaliumkonzentrationen (Bertl *et al.*, 2003). Daher wurde die pH-Abhängigkeit des Wachstums von *GFP-mKir2.1* exprimierenden Zellen (PLY240T-GFP-mKir2.1), einer entsprechender *GFP* exprimierender Kontrolle (PLY240T-GFP) und des Wildtyps (PLY232) bei verschiedenen externen K^+ -Konzentrationen untersucht (Hasenbrink *et al.*, 2005; Abb. 3.8). Die $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Dreifachmutante zeigte bei niedrigen Kaliumkonzentrationen und niedrigem pH (pH 4-5) eine deutliche Wachstumsinhibierung. Bei ansteigendem externen pH-Werten bis pH 7 war eine Verbesserung des Wachstums fast bis zum Niveau des Wildtyps zu beobachten. Die Expression von *mKir2.1* in der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Dreifachmutante führte bei pH 4 und 3-10 mM externes KCl (KCl_a) zu keiner Verbesserung des Wachstums. Möglicherweise ist unter diesen pH-Bedingungen die Untergrenze für die Aktivität des Kanals erreicht. Von pH 4,6 bis 6,4 war bei 3, 6 und 10 mM KCl_a ein

Wachstumsvorteil zu erkennen. Dieser Wachstumsvorteil war maximal bei 6 und 10 mM KCl_a und einem pH von 5,9. Der Wachstumsvorteil bei 10 mM KCl und einem pH von 5,9, sowie das unter diesen Bedingungen messbare Wachstum des Kontrollstamms PLY240T-GFP wurde als Standard für weitere Substantztests (siehe 3.2.5) genutzt. Bei 100 mM KCl wurde bei pH 6,4 und 7 ein weiterer *mKir2.1* spezifischer Phänotyp erkennbar: Die *mKir2.1* exprimierende $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante zeigte eine deutliche Wachstumsinhibierung gegenüber der entsprechenden Kontrolle ohne *mKir2.1*.

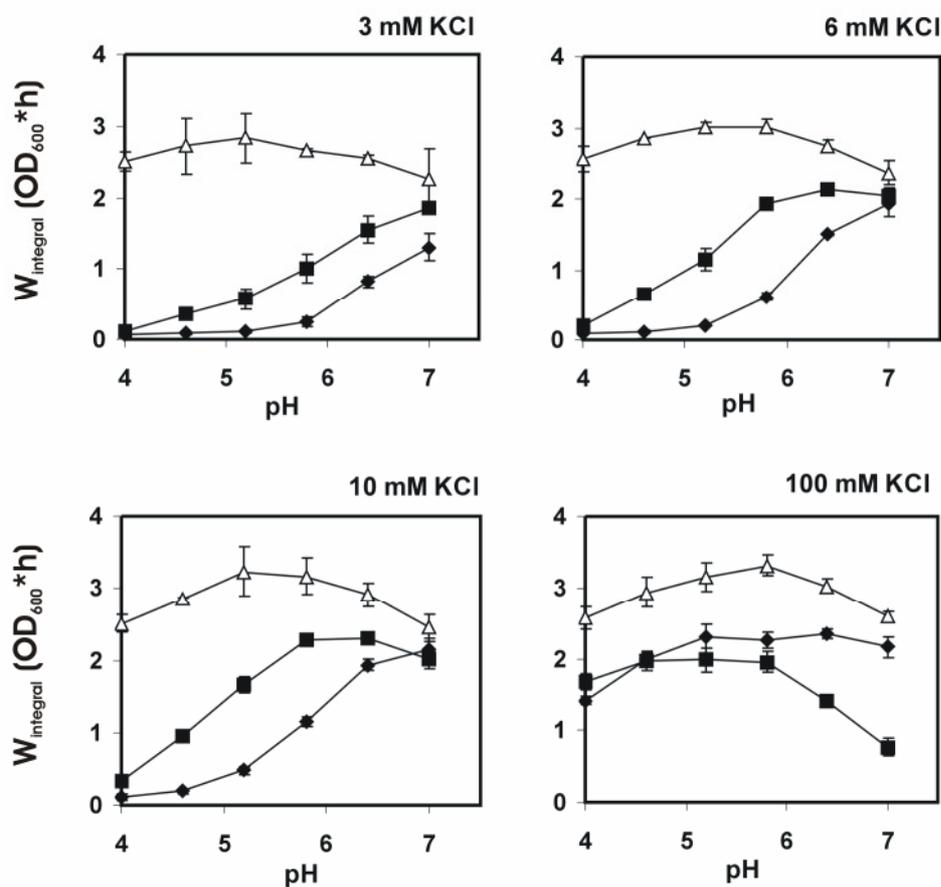


Abb. 3.8: Einfluss von externem pH und $[\text{KCl}]_a$ auf das Wachstum. Verglichen wurden $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1::\text{GFP-}mKir2.1$ Zellen (■) mit der entsprechenden Kontrolle ohne *mKir2.1* ($\Delta trk1,2$, $\Delta tok1::\text{GFP}$, ◆) und dem Wildtyp-Stamm (△). Das Wachstum wurde über die Integralmethode (2.9.3) berechnet, Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus mindestens 4 unabhängigen Tests dar (nach Hasenbrink *et al.*, 2005).

3.2.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zur Lokalisation von GFP-mKir2.1 in der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante in Abhängigkeit vom extrazellulären pH

Hierbei wurde untersucht, inwieweit die pH-Abhängigkeit des mKir2.1 spezifischen Wachstumsphänotyps (3.2.3) mit einer Veränderung der Lokalisation von GFP-mKir2.1 einhergeht. Wie in Abb. 3.9 gezeigt, waren bei 50 mM extrazellulärem KCl in ungepuffertem Medium in einem pH-Bereich von 4 bis 7 keine deutlichen Variationen im Fluoreszenzmuster von GFP-mKir2.1 erkennbar. Eine Lokalisation von GFP-mKir2.1 in der Zellperipherie, wie auch um ein Zellkompartiment, sowie eine relativ konstante Stärke des Fluoreszenzsignals konnte unter allen untersuchten Bedingungen beobachtet werden.

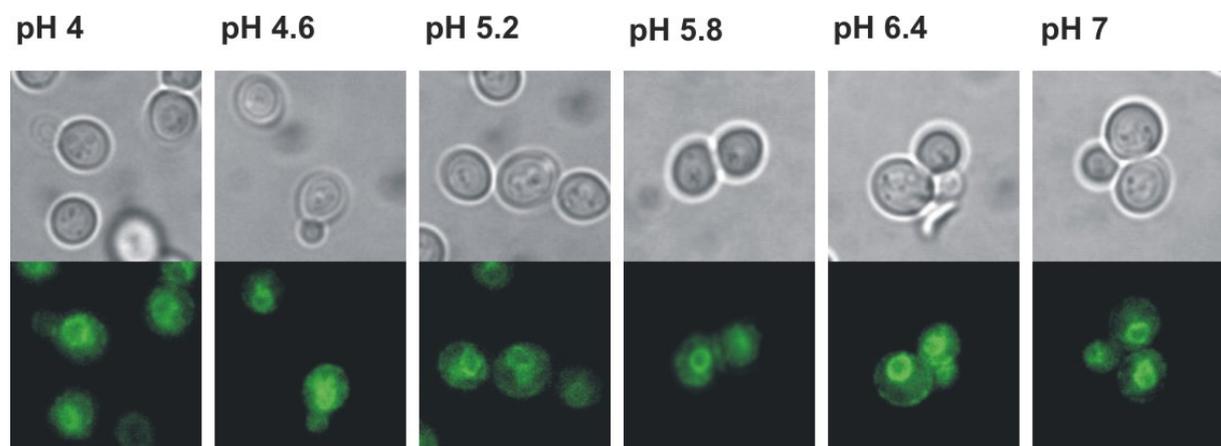


Abb. 3.9: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zur Lokalisation von GFP-mKir2.1-Fusionsproteinen in der *S. cerevisiae* $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante in Abhängigkeit vom extrazellulären pH. Alle Zellen wurden in SDAP-Medium mit 50 mM KCl jeweils mit angezeigtem pH angezogen.

3.2.5 Spezifische Inhibierung von mKir2.1 vermitteltem Wachstum

Von einigen wenigen Substanzen ist bekannt, dass sie Kir2.1 spezifisch blockieren. Für verschiedene mono- und divalente Kationen wie Ag^+ , Cs^+ und Ba^{2+} konnte eine Blockade von Kir2.1 vermittelten Strömen in elektrophysiologischen Experimenten nachgewiesen werden (Dart *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 2000; Shieh *et al.*, 1998; Schram *et al.*, 2002; Schram *et al.*, 2003).

Der Effekt dieser Ionen auf das von mKir2.1 vermittelte Wachstum in *S. cerevisiae* $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Dreifachmutanten und teilweise in $\Delta trk1,2$ -Doppelmutanten wurde unter nicht-permissiven Bedingungen (10 mM KCl_a, externer pH 5,9) getestet. Die Applikation von AgNO₃ führte zu einer Inhibierung des mKir2.1 spezifischen Wachstums mit einer EC₅₀ von $0,52 \pm 0,11 \mu\text{M}$ in der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Tripelmutante (Abb. 3.10 C) und $0,57 \pm 0,13 \mu\text{M}$ in der $\Delta trk1,2$ -Doppelmutante (PLY240L-GFP-mKir2.1, ohne Abbildung). Zytotoxische Effekte traten in den Wachstumsexperimenten jedoch bei den entsprechenden Kontrollstämmen ohne mKir2.1 schon bei geringfügig höheren Konzentrationen auf (PLY240T-GFP: EC₅₀ = $1,64 \mu\text{M}$; Abb. 3.10 C und PLY240L-GFP: EC₅₀ = $1,17 \mu\text{M}$, ohne Abbildung). Nahezu vollständige Wachstumsinhibierung trat bei beiden Stämmen bei 4 bis 8 μM Ag⁺ auf. Yang & Pon (2003) ermittelten bei *S. cerevisiae*-Zellen eine MIC₉₀ (minimale Hemmkonzentration, bei der 90 % der Hefen im Wachstum inhibiert werden) für Silber von 5 μM , wodurch die vorliegenden Ergebnisse unterstützt werden.

AgNO₃-Lösungen erwiesen sich als relativ lichtempfindlich: Bei 14-tägiger Lagerung der Stammlösungen unter Lichteinfluss stiegen die EC₅₀-Werte für die Inhibierung von mKir2.1 spezifischem Wachstum und die für zytotoxische Effekte nach Zugabe von AgNO₃ um etwa das 5fache der Werte bei Lagerung im Dunkeln (ohne Abbildung).

Bei Applikation von CsCl und BaCl₂ wurde das mKir2.1 spezifische Wachstum in der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante mit EC₅₀-Werten von $70 \pm 18 \mu\text{M}$ bzw. $2,32 \pm 0,53 \mu\text{M}$ inhibiert (Abb. 3.10 A und D). Zytotoxische Effekte traten in den entsprechenden Kontrollstämmen bei jeweils weitaus höheren Konzentrationen von Cs⁺ (EC₅₀ = 24,4 mM) und Ba²⁺ (EC₅₀ = $3,6 \pm 0,8 \text{ mM}$) auf. Da die Löslichkeit von BaSO₄ in Wasser mit ungefähr 10 μM sehr gering ist, wurde, um ein Ausfallen des Salzes zu verhindern, der SDAP-Medienbestandteil MgSO₄ durch MgCl₂ ersetzt. Eine Beeinträchtigung des Wachstums durch diesen Austausch wurde nicht festgestellt. Zur Prüfung der Spezifität der Wirkung von Cs⁺ wurde der Cs⁺-Einfluss auf das Wachstum der $\Delta trk1,2$ -Mutante bei episomaler Expression von *mKir2.1*, *TRK1* oder *TRK2* untersucht. Überlegungen für diesen Vergleich sind generelle und grundlegende Ähnlichkeiten in Porenregion und angrenzenden Transmembranhelices (MPM-Motiv) zwischen Trk-Transportern aus *S. cerevisiae* und Kaliumkanälen (Durell *et al.*, 1999). Während das Wachstum der *TRK1* bzw

TRK2 exprimierenden Zellen bei Applikation von CsCl erst mit EC_{50} -Werten oberhalb von 10 mM eindeutig inhibiert wurde, fand bei dem *mKir2.1* exprimierenden Stamm eine deutliche Wachstumsinhibierung schon im mikromolaren Bereich statt (Abb. 3.10 B). Das Wachstum des *mKir2.1* exprimierenden Stammes verringerte sich bis zu einer Konzentration von etwa 1 mM CsCl auf das Wachstumsniveau der $\Delta trk1,2$ -Mutante (PLY240 [pYEX-GFP]), wobei das *mKir2.1* spezifische Wachstum mit einer EC_{50} von 370 μ M inhibiert wurde (ohne Abbildung).

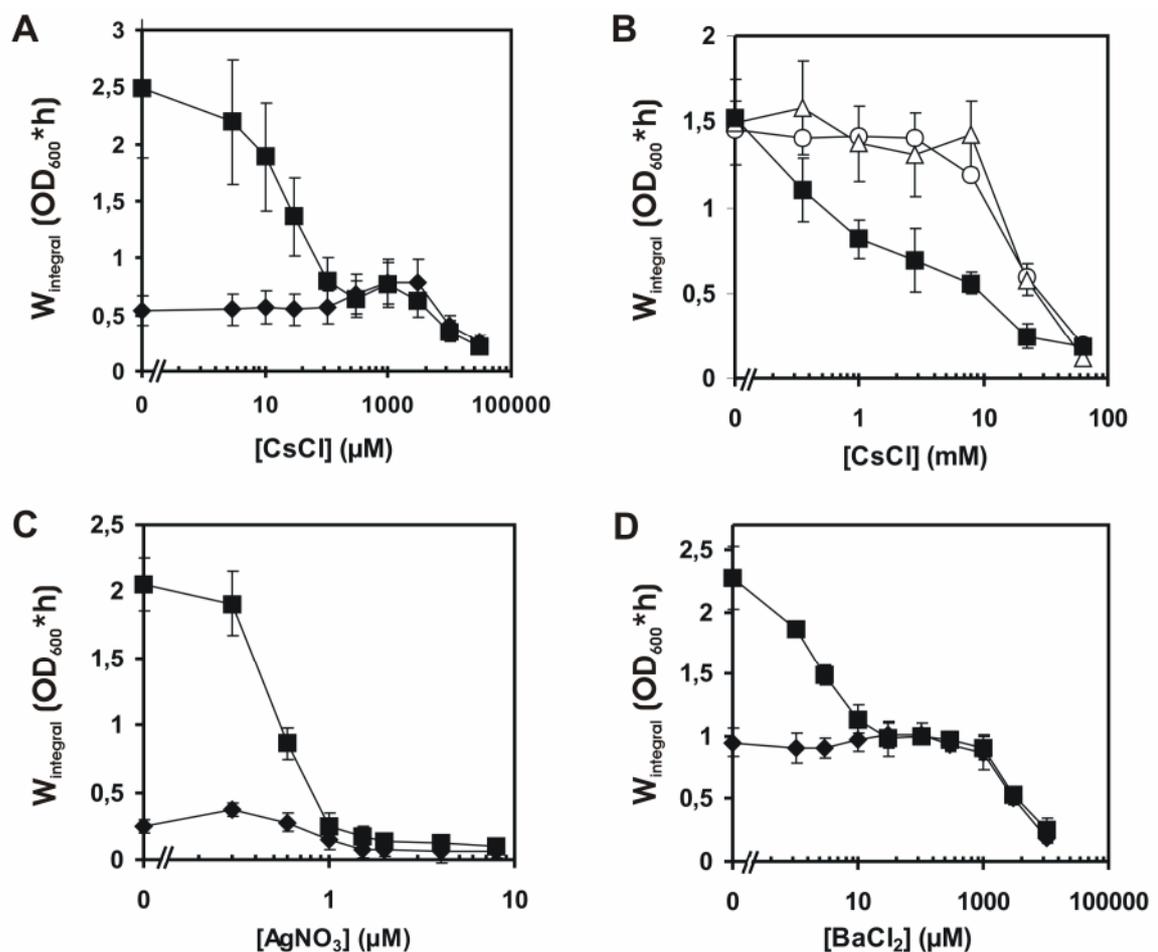


Abb. 3.10: Effekt von Cs^+ , Ag^+ und Ba^{2+} auf das Wachstum. Das durch *mKir2.1* vermittelte Wachstum bei chromosomaler Expression von *mKir2.1* in der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante (PLY240T-GFP-*mKir2.1*, \blacksquare) wurde bei 10 mM KCl spezifisch durch CsCl (EC_{50} : $70 \pm 18 \mu$ M) (A), $AgNO_3$ (EC_{50} : $0.52 \pm 0,11 \mu$ M) (C) und $BaCl_2$ (EC_{50} : $2,32 \pm 0,53 \mu$ M) (D) inhibiert. In allen Fällen zeigt die entsprechende Kontrolle ohne *mKir2.1* (PLY240T-GFP, \blacklozenge) zytotoxische Effekte mit EC_{50} -Werten von 1,17 μ M für $AgNO_3$, 24,4 mM für CsCl und $3,6 \pm 0,8$ mM für $BaCl_2$. B zeigt den Einfluss von CsCl auf das Wachstum der $\Delta trk1,2$ -Mutante bei episomaler Expression von *mKir2.1* (PLY240 pYEX-GFP-*mKir2.1*, \blacksquare) *TRK1* (PLY240 pYEX-GFP-*TRK1*, \triangle) und *TRK2* (PLY240 pYEX-GFP-*TRK2*, \circ) mit EC_{50} -Werten von jeweils 0,37 mM, 17,8 mM und 19,5 mM. Das Wachstum (W_{integral}) wurde mittels der Integralmethode (2.9.3) bestimmt. Fehlerbalken zeigen jeweils den Standardfehler (nach Hasenbrink *et al.*, 2005).

Für den Aufbau eines Testsystems für Modulatoren von *mKir2.1* wurde die $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Dreifachmutante mit stabil ins Genom integriertem *mKir2.1* (PLY240T-GFP-*mKir2.1*) und die entsprechende Kontrolle (PLY240T-GFP) ausgewählt. Um die Reproduzierbarkeit von Testergebnissen zu prüfen, wurde die Applikation von CsCl als Ringtest in drei verschiedenen Laboratorien untersucht. Für den Ringtest wurden die Hefen in SDAP-Medium ohne Zusatz von Aminosäure-drop-out-Mix angezogen, um Wechselwirkungen der Testsubstanzen mit Medienbestandteilen möglichst gering zu halten. Da die maximale Wachstumsrate der Hefen ohne Zugabe des Aminosäure-drop-out-Mix etwas reduziert war, wurde der Testansatz mit Zellen zu einer OD_{600} von 0,35 inokuliert (siehe 2.9.2). Für eine weitestgehend automatische Evaluierung der jeweiligen Wachstumskurven wurden für die aus dem Ringtest erhaltenen Wachstumskurven durch parametrische (Logistisches Modell, Gompertz- und Richards-Modell, nach Zwietering et al., 1990) und nicht-parametrische Modelle Wachstumsparameter abgeschätzt und dazu vergleichsweise das Wachstum über die Integralmethode (2.9.3) berechnet. Eine nicht parametrische, auf 'kubischer Spline' Interpolation basierende Anpassung (Fit) an die Wachstumskurven zeigte durch die Angabe eines, zur maximalen Wachstumsrate analogen Parameters, die beste Abschätzung (kleinste Vertrauensintervalle) des jeweiligen Wachstums und bot sich daher für eine Semi-Automatisierung der Wachstumsberechnung an (Hasenbrink et al., 2007). Die statistische Auswertung der Datensätze (2-Wege ANOVA) ergab signifikant niedrigere EC_{50} -Werte des *mKir2.1* exprimierenden Indikatorstammes gegenüber denen des Kontrollstammes. Es wurde kein signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Laborbedingungen sowie keine Interaktionseffekte zwischen Labor und Stamm festgestellt (Hasenbrink et al., 2007). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die über eine „Bootstrap-Analyse“ (statistisches Verfahren auf der Grundlage von Stichproben) ermittelten EC_{50} -Werte für eine Inhibierung des durch *mKir2.1* vermittelten Wachstums durch CsCl mit 81, 83 und 92 μM CsCl in allen Labor-Gruppen in nahezu identischer Höhe bestimmt wurden (Hasenbrink et al., 2007).

Unter den organischen Substanzen sind bislang ebenfalls nur sehr wenige spezifische Blocker von Kir2.1 bekannt. Dazu gehören 3-bicyclo[2.2.1]hept-2-ylbenzene-1,2-diol (48F10) und Chloroethylclonidin (CEC). In einem ebenfalls Hefe-basierten Testsystem und kontrolliert durch elektrophysiologische Tests in HEK293-

Zellen konnten Zaks-Makhina *et al.* (2004) die Substanz 48F10 als spezifischen Inhibitor von Kir2.1 identifizieren. Daher wurde analog der Effekt von 48F10 auf das Wachstum der *mKir2.1* chromosomal exprimierenden $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Dreifachmutante untersucht. Bei Applikation dieser Substanz wurde das *mKir2.1* spezifische Wachstum unter nicht permissiven Bedingungen (10 mM KCl) mit einer EC_{50} von 5,1 μ M inhibiert. Das Wachstum der entsprechenden Kontrolle ohne *mKir2.1* als Maß für die Zytotoxizität wurde mit einer EC_{50} von 28,4 μ M inhibiert (Abb. 3.11).

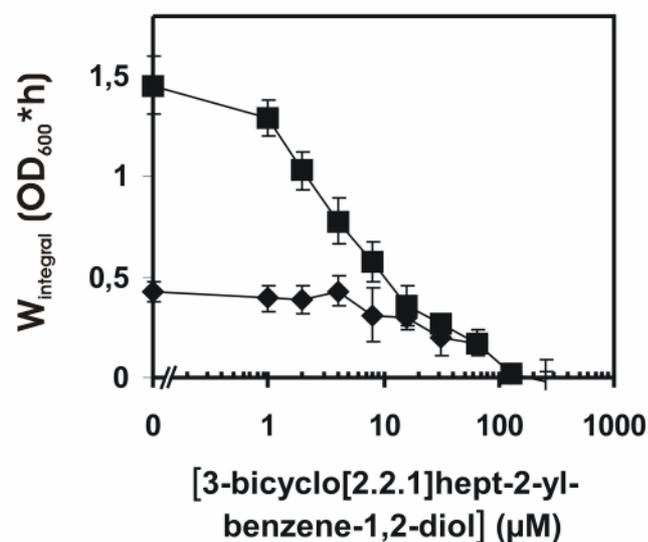


Abb. 3.11: Effekt von 48F10 auf das Wachstum. Wachstumsinhibierung der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante durch 3-bicyclo[2.2.1]hept-2-yl-benzene-1,2-diol (48F10) bei chromosomaler Expression von *GFP-mKir2.1* (PLY240T-GFP-mKir2.1, ■) und bei Expression von *GFP* allein (Kontrollstamm PLY240T-GFP, ◆). *mKir2.1* vermitteltes Wachstum wurde hierbei bei 10 mM KCl spezifisch (EC_{50} : $5,1 \pm 1,5 \mu$ M) inhibiert. Der Kontrollstamm wies zytotoxische Effekte (EC_{50} : $28,4 \pm 5,9 \mu$ M) auf. Das Wachstum (W_{integral}) wurde mittels der Integralmethode (2.9.3) bestimmt. Fehlerbalken zeigen jeweils den Standardfehler (nach Hasenbrink *et al.*, 2005).

Barret-Jolley *et al.* (1999) konnten in elektrophysiologischen Experimenten eine Blockade von Kir2.1 vermittelten Strömen durch CEC in Abhängigkeit von Membranpotential feststellen. Für die *mKir2.1* exprimierende $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Dreifachmutante konnte bei 10 mM KCl keine analoge, spezifische Inhibierung von *mKir2.1* festgestellt werden (Abb. 3.12). Im Gegenteil, bei dieser K^+ -Aufnahmemutante bewirkte die Expression von *mKir2.1* eine geringere Sensitivität gegenüber

CEC mit einer EC_{50} von 207 μM (Kontrolle: $EC_{50} = 108 \mu\text{M}$). Bei 100 mM KCl (permissive Bedingungen) verstärkte sich dieser Effekt: Für den *mKir2.1* exprimierenden Stamm konnte bis zu einer CEC-Konzentration von 512 μM keine eindeutige Wachstumsinhibierung beobachtet werden, während der Kontrollstamm mit einer EC_{50} von 80 μM CEC eine ähnliche Sensitivität wie bei 10 mM KCl auswies.

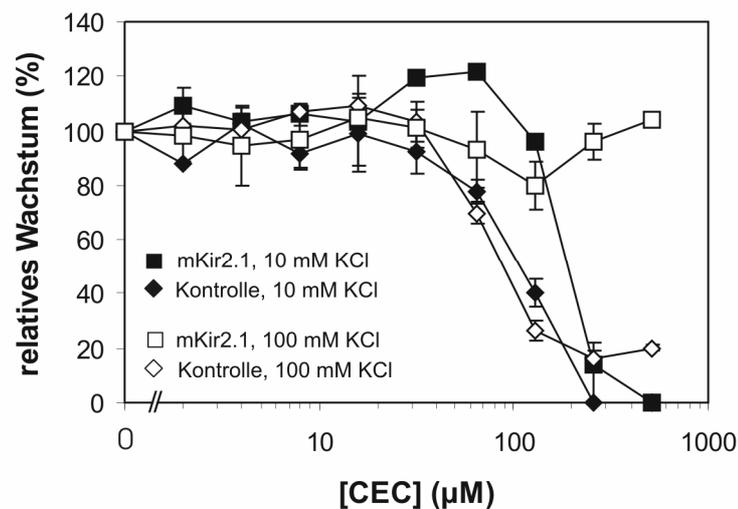


Abb. 3.12: Effekt von Chloroethylclonidin (CEC) auf das Wachstum. Bei 10 mM KCl war das Wachstum der *mKir2.1* exprimierenden $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante (PLY240T-GFP-*mKir2.1*, ■) mit einer EC_{50} von 207 μM CEC weniger sensitiv gegenüber CEC als die entsprechende Kontrolle (PLY240T-GFP, ◆) mit einer EC_{50} von 108 μM CEC. Bei 100 mM KCl konnte für den *mKir2.1* exprimierenden Stamm (□) in der untersuchten CEC-Konzentrationsbereich keine eindeutige Wachstumsinhibierung festgestellt werden, während für den entsprechenden Kontrollstamm (◇) eine EC_{50} von 80 μM CEC ermittelt werden konnte. Das Wachstum wurde jeweils mit der Integralmethode (2.9.3) bestimmt und Fehlerbalken geben den Standardfehler von jeweils 3 unabhängigen Tests an.

Das nicht sedierende Antihistaminikum Terfenadin kann eine Reihe von K^+ -Kanälen blockieren, darunter hERG, $\text{Kv}1.5$ (Roy *et al.*, 1996, Fernandez *et al.*, 2004) und $\text{Kir}6.2$ (Zünkler *et al.*, 2000). Die Untersuchung einer möglichen Blockade von $\text{Kir}2.1$ durch Terfenadin ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. Mögliche Effekte von Terfenadin auf die Funktion von $\text{mKir}2.1$ wurden in den *S. cerevisiae* $\Delta trk1,2$ - und $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutanten bei chromosomaler Expression von *mKir2.1* untersucht. Die Stämme zeigten mit und ohne Expression von *mKir2.1* eine annähernd gleiche Sensitivität gegenüber dem Antihistaminikum mit EC_{50} -Werten zwischen 49 und 54

μM Terfenadin (Abb. 3.13). Demnach traten in diesem Experiment nur zytotoxische Effekte auf und keine spezifische Inhibierung von mKir2.1 vermitteltem Wachstum.

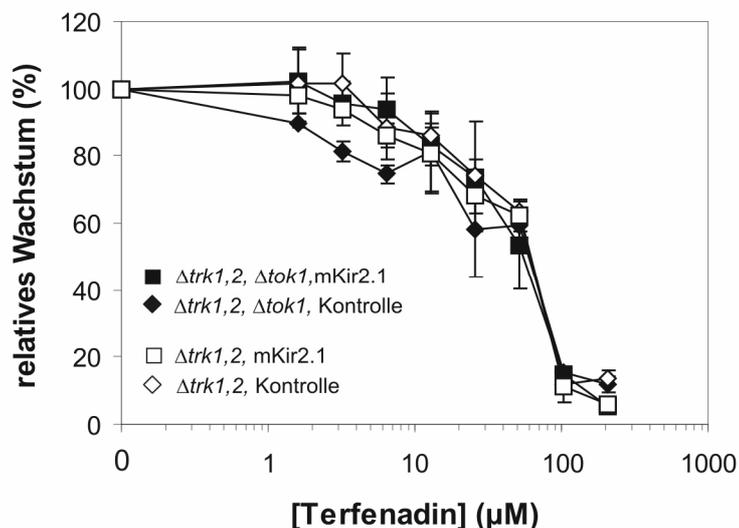


Abb. 3.13: Effekt von Terfenadin auf das Wachstum. Die Empfindlichkeit der *mKir2.1* exprimierenden $\Delta trk1,2$ - und $\Delta trk1,2, \Delta tok1$ -Mutanten (PLY240L-GFP-*mKir2.1*, \square und PLY240T-GFP-*mKir2.1*, \blacksquare) gegenüber Terfenadin war bei 10 mM KCl mit EC_{50} -Werten von 54 und 49 μM nahezu identisch mit der Empfindlichkeit der entsprechenden Kontrollen ohne *mKir2.1* (PLY240L-GFP, \diamond und PLY240T-GFP, \blacklozenge) mit EC_{50} -Werten von 53 und 52 μM . Das Wachstum wurde jeweils mit der Integralmethode (2.9.3) bestimmt und Fehlerbalken geben den Standardfehler von jeweils 3 unabhängigen Tests dar.

Huang *et al.*, (1998) konnten zeigen, dass Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) Kir2.1 in HEK293-Zellen aktiviert. Al^{3+} wiederum kann eine hoch affine Bindung mit PIP_2 eingehen (Hilgemann & Ball, 1996), so die Interaktion mit K^+ -Kanälen stören und deren Aktivität in *Xenopus* Oozyten bzw. Säugerzellen modulieren (Huang *et al.*, 1998, Ding *et al.*, 2004). In *S. cerevisiae* ist ein Großteil des zellulären PIP_2 in der Plasmamembran lokalisiert und an Prozessen wie der Stimulation von Transportern der Plasmamembran (H^+ -ATPase) beteiligt (Patton & Lester, 1992). In Anbetracht des deutlichen *mKir2.1* spezifischen Wachstumsphänotyps in *S. cerevisiae* wurde auf eine für die Aktivierung von *mKir2.1* ausreichende Konzentration von PIP_2 in der Plasmamembran geschlossen. Durch Applikation von Al^{3+} wurde nun in der Hefe untersucht, ob durch eine Inhibierung der Interaktion zwischen PIP_2 und *mKir2.1* eine Abnahme der Aktivität von *mKir2.1* und somit eine Inhibierung von *mKir2.1* vermitteltem Wachstum zu beobachten ist. Bei Applikation von 0,5 bis 128 μM AlCl_3 zeigte die $\Delta trk1,2, \Delta tok1$ -Mutante oberhalb von 32 μM AlCl_3 zytotoxische Effekte, bei Expression von *mKir2.1* in dieser Mutante

konnte jedoch keine eindeutige Inhibition von *mKir2.1* spezifischem Wachstum beobachtet werden (Abb. 3.14).

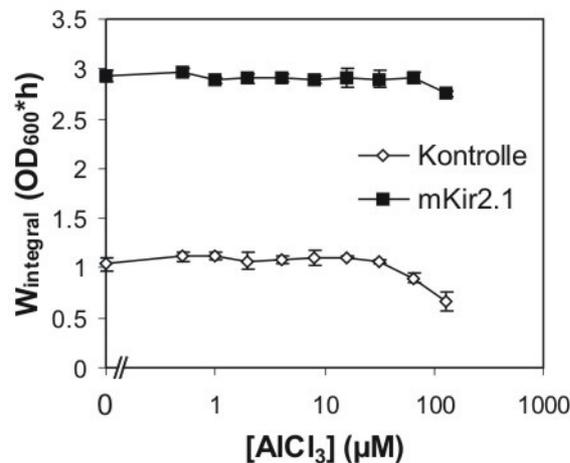


Abb. 3.14: Effekt von Al³⁺ auf das Wachstum. Das Wachstum der *mKir2.1* exprimierenden $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante (PLY240T-GFP-*mKir2.1*, ■) und der entsprechenden Kontrolle ohne *mKir2.1* (PLY240T-GFP, ◇) war gegenüber der Zugabe von Al³⁺ weitgehend unempfindlich. Oberhalb von 32 μM Al³⁺ traten insbesondere bei der Kontrolle leichte zytotoxische Effekte auf. Das Wachstum wurde jeweils mit der Integralmethode (2.9.3) bestimmt und Fehlerbalken stellen den Standardfehler von jeweils 4 unabhängigen Tests dar.

3.2.6 *mKir2.1* spezifischer Phänotyp bei 100 mM KCl

Wie aus Abb. 3.8 hervorgeht, zeigte die $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Dreifachmutante bei Expression von *mKir2.1* in Medium mit 100 mM KCl und einem nahezu neutralen pH eine eindeutige Inhibierung des Wachstums. Um den Einfluß des externen pH-Wertes bei hoher K⁺-Konzentration auf *mKir2.1* besser untersuchen zu können, wurden die Medien gepuffert, um während des Wachstums einen nahezu konstanten pH zu gewährleisten: Für einen Medien-pH-Wert von 5,9 wurde dem Medium 20 mM MES und für einen pH-Wert von 7 20 mM MOPS zugegeben. In MES-gepuffertem Medium bei 100 mM KCl änderte sich der pH nach 12,5 h lediglich um 0,2 pH-Einheiten von pH 5,9 auf 5,7, während in ungepuffertem Medien der externe pH auf 3,9 sank.

Das Wachstum der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante in gepufferten Medien mit pH 5,9 und 7 (Abb. 3.16, S. 71) ist gegenüber dem in ungepufferten Medien (Abb. 3.8) in erster Linie durch eine höhere Toleranz gegenüber niedrigen Kaliumkonzentrationen charakterisiert. In gepuffertem Medium findet bei pH 5,9 und 7 und Expression von

mKir2.1 ab etwa 25 mM KCl eine deutliche Wachstumsinhibierung statt, die mit steigender $[KCl]_a$ zunimmt. Bei 100 mM KCl_a ist das Wachstum um fast 30 % bei pH 5.9 und fast 70 % bei pH 7 reduziert (Abb. 3.16).

3.2.6.1 Effekt von CsCl auf den *mKir2.1*-spezifischen Wachstumsphänotyp bei 100 mM KCl in gepuffertem Medium

Zur Überprüfung, dass die Aktivität von *mKir2.1* Ursache für die beobachtete Wachstumsinhibierung der *mKir2.1* exprimierenden K^+ -Aufnahme-Mutante bei leicht saurem bis neutralen pH und 100 mM K^+ ist, wurde das Wachstum bei 100 mM KCl und Applikation von CsCl untersucht (Abb. 3.15). Durch Applikation dieses *Kir2.1*-Blockers (Thompson *et al.*, 2000) wurde der wachstumsreduzierende Effekt von *mKir2.1* mit EC_{50} -Werten von 571 μ M CsCl bei pH 5.9 und 335 μ M CsCl bei pH 7 aufgehoben. Bei CsCl-Konzentrationen ≥ 10 mM zeigten der *mKir2.1* exprimierende Stamm, verglichen mit dem Kontrollstamm, etwa gleiches Wachstum und somit keine wachstumsreduzierende Wirkung von *mKir2.1*.

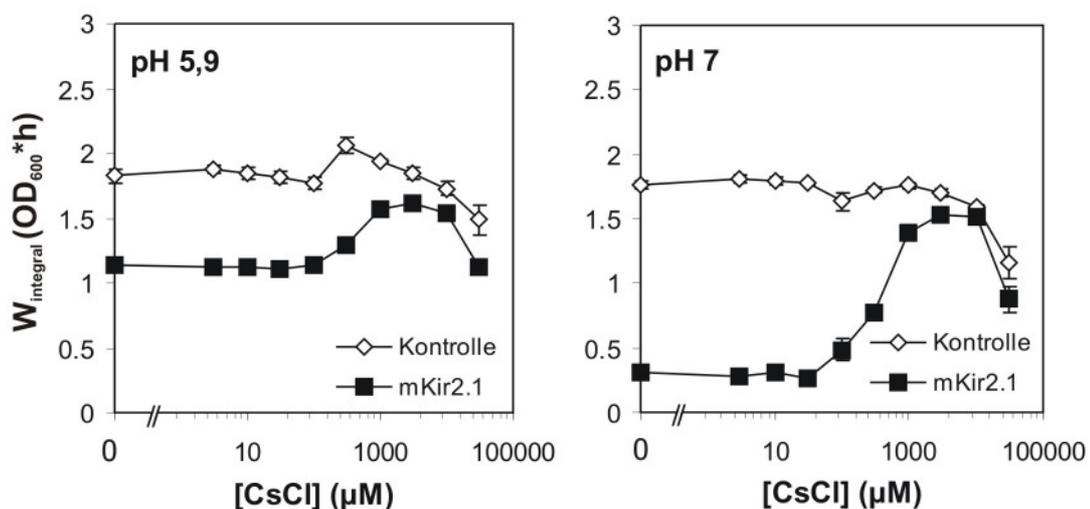


Abb. 3.15: Effekt von CsCl auf die wachstumsreduzierende Wirkung von *mKir2.1* bei 100 mM KCl in gepufferten Medien. Die durch Expression von *mKir2.1* in der $\Delta trk1,2, \Delta tok1$ -Mutante (PLY240T-GFP-*mKir2.1*, ■) verursachte Wachstumsinhibierung gegenüber der Kontrolle (PLY240T-GFP, ◇) wurde bei Applikation von CsCl mit EC_{50} -Werten von 571 μ M bei pH 5,9 und 335 μ M bei pH 7 aufgehoben. Das Wachstum W_{integral} wurde jeweils über die Integralmethode (2.9.3) berechnet. Fehlerbalken im Diagramm entsprechen jeweils dem Standardfehler aus 4 unabhängigen Tests.

3.2.6.2 Ist ein erhöhter ATP-Verbrauch durch das K⁺-Efflux-System Ena1 Ursache für die Wachstumsinhibierung bei 100 mM KCl bei Expression von *mKir2.1*?

Unter der Annahme, dass bei annähernd neutralem externen pH (pH_a) die Aktivität von *mKir2.1* steigt, kann es bei hohem $[\text{K}^+]_a$ zu einem erhöhten K⁺-Influx und möglicherweise zu einem Überschuss an K⁺-Ionen in der Zelle kommen. Eine Aufrechterhaltung der K⁺-Homöostase kann in *S. cerevisiae* durch die Regulation eines Gleichgewichts zwischen Influx und Efflux über die Plasmamembran, sowie durch Sequestrierung von K⁺-Ionen in intrazellulären Kompartimenten gewährleistet werden. Die Komponenten des Efflux-Systems, mit dem ein K⁺-Überschuss ausgeglichen werden kann, sind der Na⁺/H⁺-Antiporter Nha1p und die Na⁺-ATPase Ena1p, beide mit K⁺-Transportaktivität, und der K⁺-Kanal Tok1. Während Nha1p vornehmlich bei saurem pH_a aktiv ist, ist die Ena1-ATPase bei neutralen bis alkalischen pH_a -Werten aktiv (Banuelos *et al.*, 1998). Bei annähernd neutralem pH_a könnte somit (bei erhöhter Aktivität von *mKir2.1*) ein erhöhter ATP verbrauchender K⁺-Efflux über Ena1p stattfinden. Dieser erhöhte ATP-Verbrauch könnte ursächlich dem reduzierten Wachstumsphänotyp zugrunde liegen. Dann würde bei annähernd neutralem pH_a bei Expression von *ENA1* eine höhere Sensitivität gegenüber hohem $[\text{KCl}]_a$ und entsprechend geringeres Wachstum zu beobachten sein als in Δena1 -Zellen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde das Wachstum der $\Delta\text{trk1,2}$, Δtok1 -Dreifachmutante mit dem der K⁺-Effluxmutante $\Delta\text{trk1,2}$, Δtok1 , Δnha1 , $\Delta\text{ena1-4}$ jeweils mit und ohne Expression von *mKir2.1* bei steigenden KCl-Konzentrationen verglichen (Abb. 3.16). Die Disruption beider K⁺-Efflux-Systeme bei pH 5.9 (MES-gepuffert) und pH 7 (MOPS-gepuffert) bewirkte an sich schon eine höhere Sensitivität gegenüber hohen KCl-Konzentrationen und das unabhängig davon, ob *mKir2.1* exprimiert war oder nicht. Da dieser Effekt eine mögliche Sensitivitätssteigerung gegenüber hoher $[\text{K}^+]_a$ (aufgrund eines erhöhten ATP-Verbrauchs durch Ena1p) überlagerte, konnte keine Aussage über den Einfluss eines Ena1p vermittelten ATP-Verbrauchs als Ursache für die beobachtete Wachstumsinhibierung bei Expression von *mKir2.1* gemacht werden.

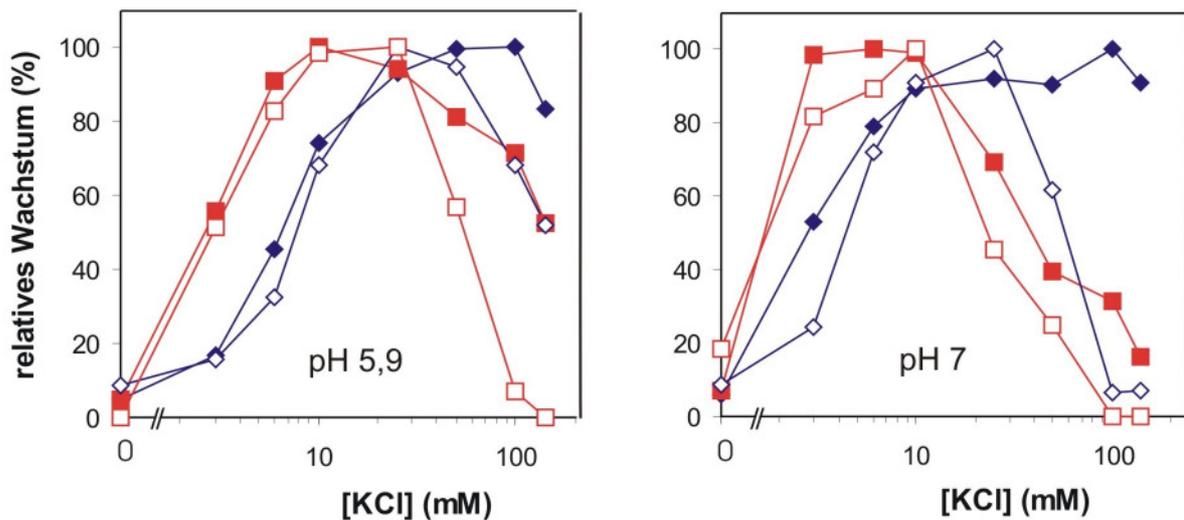


Abb. 3.16: Einfluß der K^+ -Konzentration auf das Wachstum in gepuffertem Medium bei pH 5,9 (MES-Puffer) und pH 7 (MOPS-Puffer). Untersucht wurden die *mKir2.1* exprimierende $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante (PLY240T-GFP-*mKir2.1*, ■) mit entsprechender Kontrolle ohne *mKir2.1* (PLY240T-GFP, ◆) im Vergleich mit der *mKir2.1* exprimierenden $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$, Δnha , $\Delta ena1-4$ -Mutante (PLY246-ne [pYEx-GFP-*mKir2.1*], □) mit entsprechender Kontrolle ohne *mKir2.1* (PLY246-ne [pYEx-GFP], ◇). Das Wachstum wurde mittels der Integral-Methode (2.9.3) bestimmt und der jeweils höchste Wert als 100 % gesetzt.

3.2.6.2 Applikation von Hygromycin B in ungepufferten und gepufferten Medien

Ein Influx positiver Ladungen über die Plasmamembran via *mKir2.1* bewirkt eine Depolarisation des Membranpotentials. Da einige Transportprozesse über die Plasmamembran durch das Membranpotential energetisiert werden (Serrano, 1991; van der Rest *et al.*, 1993), könnte eine starke Depolarisierung der Plasmamembran, bedingt durch einen verstärkten Influx von K^+ über *mKir2.1*, zu einer Beeinträchtigung essentieller Transportprozesse und damit zu einer Verschlechterung des Wachstums führen. Daher wurde der Einfluss von *mKir2.1* auf das Membranpotential bei 100 mM KCl durch die Applikation von Hygromycin B, einem potentiellen Indikator des Membranpotentials (Perlin *et al.*, 1988), untersucht. Bei einem Anstieg von 20 mM KCl auf 100 mM KCl in ungepuffertem Medium (pH 5,9) zeigte die $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Dreifachmutante mit und ohne Expression von *mKir2.1* eine jeweils deutlich geringere Empfindlichkeit (9fach bzw. 25fach) gegenüber dem toxisch wirkenden Antibiotikum (Abb. 3.7 und 3.17 A). Allerdings wies der *mKir2.1* exprimierenden Stamm bei 100 mM KCl in ungepuffertem Medium eine etwas

höhere Empfindlichkeit als der Wildtyp auf. Unter sehr ähnlichen Bedingungen (pH 5,8; 100 mM KCl) war ein inhibitorischer Effekt von *mKir2.1* nur schwach oder gar nicht ausgebildet (Abb. 3.8). Bei pH 5,9 und 100 mM KCl führte die Pufferung des Mediums mit 20 mM MES bei dem Wildtyp und der *GFP* exprimierenden $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante zu einer deutlichen Erhöhung der Sensitivität gegenüber Hygromycin B. Eine Erklärung dafür wäre ein ‚Abfangen‘ der über die H^+ -ATPase Pma1p exportierten Protonen durch den Puffer, wodurch der H^+ -Export in geringerem Maße gegenüber ungepuffertem Medium zum Aufbau eines H^+ -Gradienten genutzt wird. Da sich die freie Energie (ΔG) für den H^+ -Export über Pma1p auch aus dem H^+ -Gradienten berechnet – bei kleinerem ΔpH wird ΔG auch kleiner – wäre der H^+ -Export somit in gepuffertem Medium energetisch begünstigt. Dadurch könnte ein stärker hyperpolarisiertes Membranpotential entstehen, was mit einer erhöhten Sensitivität der Hefen gegenüber Hygromycin B einhergehen würde. Bei Expression von *mKir2.1* in der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante war in gepuffertem Medium bei pH 5,9 und 7 nur eine sehr geringe Sensitivität gegenüber Hygromycin B mit EC_{50} -Werten von 174 bzw. 187 μM Hygromycin B (Abb. 3.17 B-D) zu erkennen. Diese geringe Sensitivität bei 100 mM KCl könnte ein Indiz für eine starke und wachstumsinhibierend wirkende (vergleiche Abb. 3.16) Depolarisation der Plasmamembran sein. Der Unterschied in den EC_{50} -Werten bei dem *mKir2.1* exprimierenden Stamm bei pH 5,9 (MES gepuffert) und pH 7 (MOPS gepuffert) bei 100 mM KCl war weder deutlich noch signifikant, wodurch eine Erklärung für die stärker inhibitorische Wirkung von *mKir2.1* bei pH 7 (Abb. 3.16) weiter offen bleibt. Einzig die $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Dreifachmutante zeigte eine deutliche Verringerung der Sensitivität bei einem pH-Sprung von pH 5,9 (MES) zu pH 7 (MOPS), was möglicherweise durch eine bei pH 7 stärkere, auf die Plasmamembran depolarisierend wirkende Aktivität des von Bihler *et al.* (1998) untersuchten unspezifischen Ionenkanals NSC1 zu erklären ist.

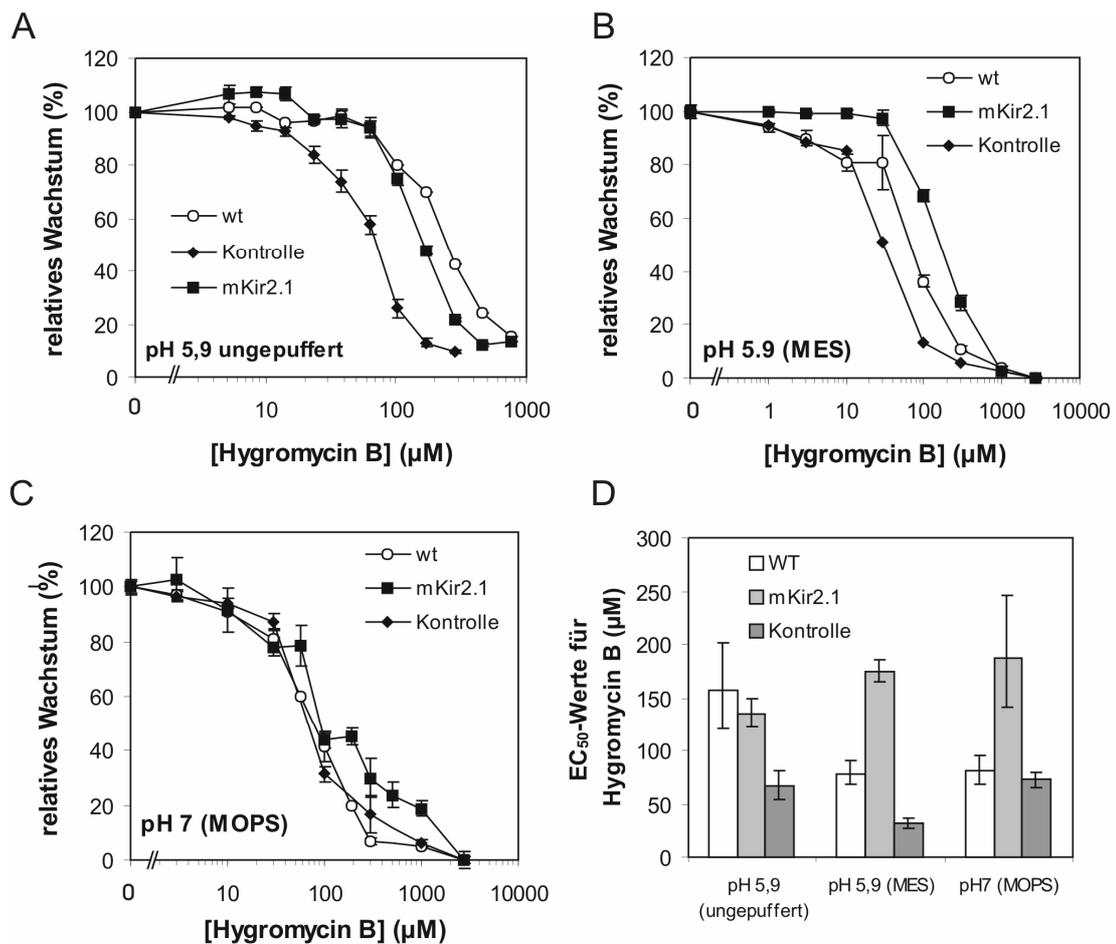


Abb. 3.17: Effekt von Hygromycin B bei 100 mM KCl in ungepufferten und gepufferten Medien auf das Wachstum. A-C: Das Wachstum der *mKir2.1* exprimierenden $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante (PLY240T-GFP-*mKir2.1*, ■) wurde dabei mit dem entsprechenden Kontrollstamm ohne *mKir2.1* (PLY240T-GFP, ◆) und dem Wildtyp (PLY232, ○) bei pH 5.9 in ungepuffertem Medium (A), bei pH 5.9 in mit 20 mM MES gepuffertem Medium (B) sowie bei pH 7 in mit 20 mM MOPS gepuffertem Medium (C) verglichen. In D werden die aus dem Inhibierungskinetiken ermittelten EC₅₀-Werte für Hygromycin B dargestellt. Das Wachstum von WT, *mKir2.1* exprimierender Mutante und Mutante ohne *mKir2.1* (Kontrolle) wurde mit folgenden EC₅₀-Werten inhibiert: 156, 135 bzw. 66 μM Hygromycin B bei pH 5,9 in ungepuffertem Medium, 78, 174 bzw. 32 μM Hygromycin B bei pH 5,9 in gepuffertem Medium und 81, 187 und 73 μM Hygromycin B bei pH 7 in gepuffertem Medium. Das Wachstum wurde mittels der Integral-Methode (2.9.3) bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren jeweils den Standardfehler.

3.2.7 Expression von *mKir2.1* in *S. cerevisiae*-Stämmen mit defektem K⁺-Export-System

Die Expression von *mKir2.1* führte in *S. cerevisiae*-Mutanten mit Disruptionen in K⁺-Efflux-Systemen (Δnha , $\Delta ena1-4$ -Mutante B31 und $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$, Δnha , $\Delta ena1-4$ -Mutante MAB 2d) zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber hohen K⁺-Konzentrationen (Kolacna *et al.*, 2005). Bei 150 mM KCl war das Wachstum des

GFP-mKir2.1 exprimierenden B31- und MAB 2d-Stammes zu annähernd 90 % gegenüber der jeweiligen Kontrolle (Expression von *GFP*) gehemmt (Abb. 3.18). Die Wachstumsinhibierung bei Expression von *mKir2.1* konnte durch die Applikation von BaCl_2 mit EC_{50} -Werten von ca. 500 μM Ba^{2+} aufgehoben werden. Diese EC_{50} -Werte sind jedoch eher als Untergrenze anzusehen, zumal bei $[\text{Ba}^{2+}] \geq 1000 \mu\text{M}$ starke zytotoxische Effekte (siehe Kontrollstämme) die Aufhebung der *mKir2.1* spezifischen Inhibierung überlagerten.

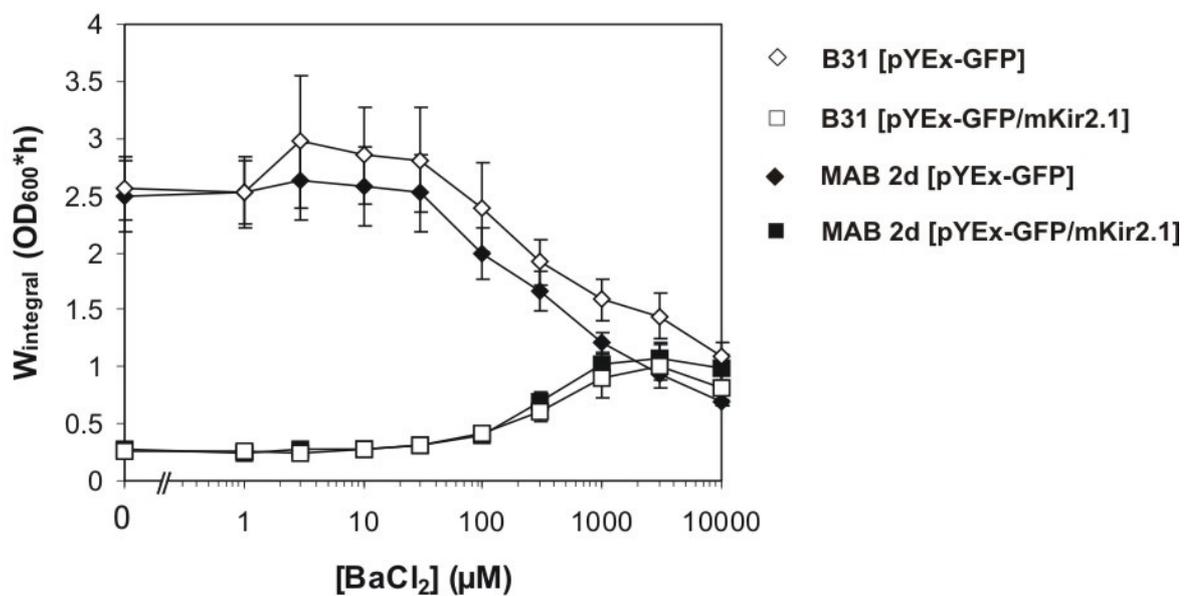


Abb. 3.18: Effekt von BaCl_2 bei 150 mM KCl auf das Wachstum von *S. cerevisiae* K^+ -Export-Mutanten B31- bzw. MAB 2d jeweils bei Expression von *GFP-mKir2.1* oder *GFP* als Kontrolle. Die Wachstumsinhibierung des B31- und MAB 2d-Stammes bei Expression von *mKir2.1* wurde bei Applikation von Ba^{2+} mit EC_{50} -Werten von $480 \pm 54 \mu\text{M}$ bzw. $543 \pm 125 \mu\text{M}$ aufgehoben. Das Wachstum wurde mittels der Integral-Methode (2.9.3) bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren jeweils den Standardfehler aus 4 unabhängigen Tests (nach Kolacna *et al.*, 2005).

Auch bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur Lokalisation von episomal exprimierten *GFP-mKir2.1*-Fusionskonstrukten bzw. *GFP* allein (Kontrolle) konnte ein *mKir2.1* spezifisches *GFP*-Fluoreszenzmuster beobachtet werden. Dabei konnte episomal exprimiertes *GFP-mKir2.1* ähnlich der Expression in *S. cerevisiae* $\Delta\text{trk1,2}$ -Mutanten (Abb. 3.5 B) rund um eine intrazelluläre Struktur und in einer ringförmigen Struktur in der Zellperipherie lokalisiert werden (Abb. 3.19).

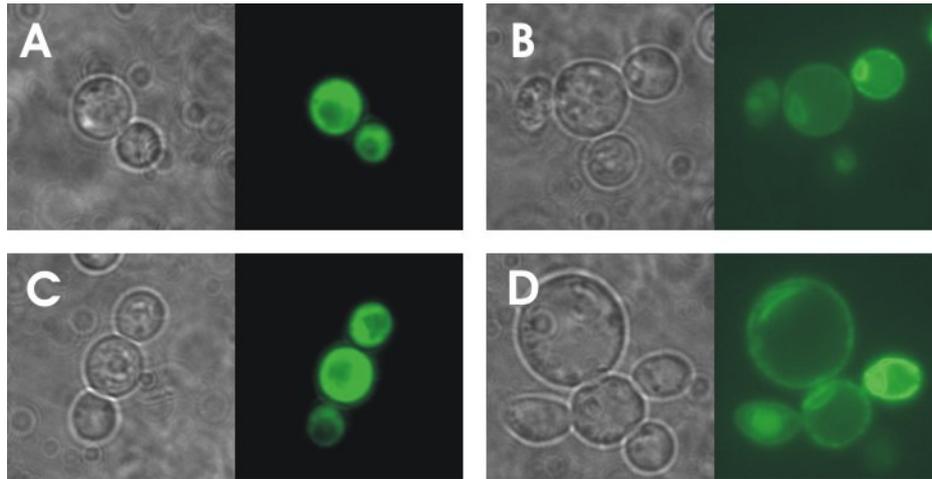


Abb. 3.19: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zur Lokalisation von GFP-mKir2.1-Fusionsproteinen bzw. GFP (Kontrolle) in *S. cerevisiae* K⁺-Export-Mutanten: A und B: $\Delta nha, \Delta ena1-4$ -Mutante B31 bei episomaler Expression von GFP (A) bzw. GFP-mKir2.1 (B). C und D: $\Delta trk1,2, \Delta tok1, \Delta nha, \Delta ena1-4$ -Mutante MAB 2d bei episomaler Expression von GFP (C) bzw. GFP-mKir2.1 (D).

4 Diskussion

Die humanen Kaliumkanäle hERG und Kir2.1 tragen wesentlich zur Repolarisierung des kardialen Membranpotentials bei (Sanguinetti & Jurkiewicz 1990; Sanguinetti *et al.*, 1995; Wible *et al.*, 1995; Yan & Ishihara, 2005). Fehlfunktionen in diesen Kanälen können zu einer Verzögerung der kardialen Repolarisation führen (Abb. 1.5 Ba-Bc). Im Oberflächen-EKG resultiert diese Verzögerung in einer Verlängerung des QT-Intervalls (Abb. 1.5 C) und in spontanem Auftreten von Herzrhythmusstörungen vom Typ der Torsades des pointes (TdP, Abb. 1.5 D) (Tristani-Firouzi *et al.*, 2002; Sanguinetti & Tristani-Firouzi, 2006). TdPs können zu Kammernflimmern degenerieren und zu plötzlichem Herztod führen (Haverkamp, 2001). Das Auftreten von QT-Intervallverlängerung und TdPs werden unter dem Begriff QT- oder LQT-Syndrom zusammengefasst; dabei können LQT-Syndrome auf erblichen oder erworbenen Ursachen beruhen (Haverkamp, 2001). Bei den erworbenen Ursachen hat die durch Arzneimittel verursachte Blockade von hERG-Kanälen die bei weitem größte Bedeutung (Sanguinetti & Mitcheson, 2005). Daher ist die Suche nach potentiellen Modulatoren von hERG und anderen an der kardialen Repolarisation beteiligten K⁺-Kanälen, wie z.B. K⁺-Kanal-Öffnern (KCOs, Lawson, 2000) von großem pharmakologischen und toxikologischen Interesse. Mit automatisierten Screening-Methoden unter Verwendung von Modellsystemen könnten große Substanz-Bibliotheken auf entsprechende Modulatoren hin untersucht, aber auch potentielle Nebenwirkungen abgeschätzt werden. Das erste Hochdurchsatz-screening-System für Modulatoren von kardialen K⁺-Kanälen auf Basis der Hefe *S. cerevisiae* stellten Zaks-Makhina *et al.* (2004) für den K⁺-Kanal Kir2.1 vor. Eine funktionelle Expression von hERG-K⁺-Kanälen in *S. cerevisiae* wurde bislang nicht publiziert.

Das wesentliche Ziel meiner Arbeit war die Charakterisierung von *S. cerevisiae*-Stämmen, die, im Hinblick auf die mögliche Eignung als pharma-/toxikologisches Durchmusterungssystem, die K⁺-Kanäle hERG oder mKir2.1 chromosomal oder episomal exprimieren.

Eine erfolgreiche heterologe Expression von Säuger-Membranproteinen in der Hefe setzt die korrekte Synthese, Faltung, Glykosylierung und den korrekten Transport zur Membran des heterologen Proteins voraus. Trotz hoher Ähnlichkeit in Biochemie und Zellstrukturen bei Hefen im Vergleich mit Zellen höherer Tiere und Pflanzen, können

heterolog exprimierte Plasmamembranproteine in intrazellulären Strukturen retardieren: Villalba *et al.* (1992) und Regenberg *et al.* (1995) beschrieben eine Retardierung eines Großteils der in *S. cerevisiae* heterolog exprimierten Plasmamembran-H⁺-ATPasen aus *Arabidopsis thaliana* im ER. Eine Retardierung des heterolog in *S. cerevisiae* exprimierten Glukosetransporters Glut4 aus der Ratte in intrazellulären Membranen sowie ein Fehlen des Aktivitätsnachweises von Glut4 wurden von Kasahara & Kasahara (1997) beschrieben. Desweiteren haben Prinz *et al.* (2003) bei der heterologen Expression des humanen Transferrin-Rezeptors TfR in *S. cerevisiae* dessen überwiegende Lokalisation im ER beobachtet. Es ist daher für jedes in *S. cerevisiae* heterolog exprimierte Gen spezifisch dessen Lokalisation und Funktion zu prüfen.

4.1 Expression von *HERG* in *S. cerevisiae* K⁺-Aufnahme-Mutanten

4.1.2 Fehlende Komplementation des Wachstums von K⁺-Aufnahme-Mutanten

Abgeleitet aus den Ergebnissen der Wachstumstests führte die Expression von *HERG*-Wildtyp und *HERG*-Mutanten in K⁺-Aufnahme-Mutanten ($\Delta trk1,2$ oder $\Delta trk1,2, \Delta tok1$) nicht zur Komplementation des mutanten Phänotyps (3.1). Damit einhergehend fehlte die Lokalisation von GFP-Fusionskonstrukten in der Plasmamembran (3.2).

Da Fälle bekannt sind, bei denen die Fusion mit einem GFP-Fluorophor zu einem fehlerhaften Transport (Natter *et al.*, 2005) oder einer Funktionsänderung (Lehmann *et al.*, 2006) eines Membranproteins führen kann, wurde die Expression von *HERG* mit und ohne fusioniertem Fluorophor untersucht. In beiden Fällen kam es zu keiner Komplementation des mutanten Wachstumsphänotyps. Als mögliche Ursache liegt nahe, dass tatsächlich kein hERG-Kanal in die Plasmamembran integriert wurde bzw. kein hERG-Kanal so lange dort verweilt, dass ein Wachstumseffekt beobachtet werden könnte. Eine andere mögliche Begründung fußt auf dem Öffnungsverhalten (Gating) von verzögerten Gleichrichter-K⁺-Kanälen. Der hERG-Kanal öffnet nur bei Depolarisation der Membran oberhalb von Membranpotentialen von -50 mV (Sanguinetti *et al.*, 1995). Für das Ruhepotential in Wildtyp *S. cerevisiae* Zellen wird ein Wert von ca. -180 bis -200 mV angenommen (persönliche Mitteilung, Adam

Bertl). Nach Madrid *et al.* (1998) ist zudem in $\Delta trk1,2$ -Mutanten das Membranpotential stark hyperpolarisiert. Nur unter der Voraussetzung, dass das Membranpotential auch Werte positiver als -50 mV erreicht, kann daher ein K^+ -Strom über hERG erfolgen. Je positiver eine Depolarisation der Membran oberhalb des Schwellenwertes von -50 mV ist, desto schwieriger wird unter den vorliegenden Testbedingungen der Einstrom von K^+ in die Zelle: Ein positiveres Membranpotential verschiebt bei einem starken K^+ -Konzentrationsgradienten von außen (10 mM) nach innen (200-300 mM, Rodriguez-Navarro, 2000) das elektrochemische Potential zu Ungunsten des K^+ -Einstroms und oberhalb von 0 mV kommt es zu einer Inaktivierung von hERG (Sanguinetti *et al.*, 1995). Der K^+ -Einstrom im konstruierten Stamm hängt also im Wesentlichen von der besonderen Eigenschaft von verzögerten Gleichrichtern wie hERG ab, sich bei einer Repolarisation der Membran schnell von der Inaktivierung zu erholen und eine relativ langsame Deaktivierung aufzuweisen (Trudeau *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1996). Bei innen stark negativem Membranpotential und (noch) nicht wieder geschlossenem Kanal sollte das elektrochemische Potential bei 10 mM extrazelluläres K^+ (K^+)_a und 200-300 mM intrazelluläres K^+ (K^+)_i für K^+ -Ionen einen K^+ -Einstrom begünstigen. Möglicherweise waren die Ereignisse, die unter den gegebenen Versuchsbedingungen einen K^+ -Einstrom begünstigten, zu selten, um den mutanten Phänotyp zu komplementieren. Andererseits wäre auch eine Reduzierung des K^+ -Gradienten über der Plasmamembran über K^+ -Auswärtsströme bei weniger stark negativem Membranpotential möglich. Eine Expression von *HERG* in Wildtyp-Zellen mit einem weniger stark negativen Membranpotential könnte die Wahrscheinlichkeit, ein den Kanal aktivierend wirkendes Membranpotential von mehr als -50 mV zu erreichen, erhöhen. Das Wachstum sollte dann zudem unter hohen $[KCl]_a$ untersucht werden, da sich unter der Annahme, dass sich das Membranpotential dabei nicht oder nur geringfügig ändert, das elektrochemische Potential für K^+ (Gleichung 4.1) hin zu günstigeren Werten für den K^+ -Einstrom verschiebt.

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln \frac{[K^+]_i}{[K^+]_a} + z \cdot F \cdot \Delta \psi \quad (\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}) \quad \text{Gleichung 4.1}$$

Dabei ist ΔG die Freie Energie für einen Einstrom von K^+ in die Zelle, R die Allgemeine Gaskonstante ($R = 8,3143 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), T die Temperatur in Kelvin, z die

Wertigkeit des Ions (für $K^+ = 1$), F die Faraday -Konstante ($F = 96485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$) und $\Delta\psi$ das Membranpotential in Volt. Unter der Annahme einer $[K^+]_i$ von 250 mM (siehe oben) und 30 °C wäre demnach ein K^+ -Einstrom bei 10 mM K^+_a bei $\Delta\psi < -84 \text{ mV}$ und bei 100 mM K^+_a schon bei $\Delta\psi < -24 \text{ mV}$ begünstigt.

Analog zum Phänotyp des *mKir2.1* exprimierenden Stammes bei 100 mM KCl_a und pH 7 (Abb. 3.8 und 3.16) könnte die Expression von *HERG* bei solchen und höheren $[KCl]_a$ zu einer Wachstumsinhibierung des Wildtyps und damit zu einem (pharma-/toxikologisch) testbaren Wachstumsphänotyp führen.

4.1.1 Lokalisation von hERG in der Plasmamembran

Eine Lokalisation von hERG-GFP-Fusionsproteinen in der Plasmamembran von *S. cerevisiae* $\Delta trk1,2$ - oder $\Delta trk1,2, \Delta tok1$ -Mutanten konnte nicht beobachtet werden (Abb. 3.1). Möglicherweise werden hERG Untereinheiten bei ihrem Transport entlang des sekretorischen Weges von Mechanismen der Qualitätskontrolle als fehlerhaft gefaltet oder zusammengelagert erkannt und der Degradation zugeführt. Die Hauptkomponenten dieser Qualitätskontrolle sind das Zurückhalten (Retention) im ER, die ER-assoziierte Degradation (ERAD), die Wiedergewinnung von fehlerhaft aus dem ER weitergeleiteten Proteinen aus dem stromabwärts liegenden Golgi-Komplex (retrograder Transport) und die Umleitung vom Golgi-Komplex zu den Lysosomen bzw. in *S. cerevisiae* zu den Vakuolen (Ellgaard, 1999). Darüber hinaus können Proteine in das endosomale System gelangen, nachdem sie zur Plasmamembran geleitet und wieder internalisiert wurden (Arvan *et al.* 2002, Hicke & Dunn, 2003).

Es wurden daher verschiedene, in der Literatur als erfolgreich beschriebene Methoden angewendet, um eine Oberflächenlokalisierung zu erreichen. In dem hier beschriebenen Hefemodell bewirkte aber weder der Wechsel des GFP-Fluorophor vom C- zum N-Terminus (zur Maskierung eines eventuell durch GFP-Fusion demaskierten ER-Retentionssignals), die Mutation des ER-Retentionssignals RGR (nach Kupersmidt *et al.*, 2002; Jenke *et al.*, 2003), das Anhängen eines ER-Exportsignals (FCYENE, nach Ma *et al.*, 2001), noch die Applikation chemischer Chaperone (nach Sato *et al.*, 1996; Bebök *et al.*, 1998 und Choo-Kang & Zeitlin, 2001) eine verbesserte Oberflächenlokalisierung von GFP-fusioniertem hERG. Das GFP-Fluoreszenzmuster wies jeweils auf eine Lokalisation der Fusionsproteine in

intrazellulären Kompartimenten hin und zeigte punkt- oder bananenförmige Strukturen (Abb. 3.1).

Unter der Annahme, dass die GFP fusionierten hERG-Untereinheiten entlang des sekretorischen Weges retardieren, könnten die punktförmigen Fluoreszenzstrukturen auf Lokalisation im Golgi-Apparat, Vesikeln (COPI- und COPII-Vesikel sowie Clathrin-umhüllte Vesikel) oder Endosomen hinweisen (vergleiche hierzu Yeast Protein Localization Database (YPL.db), <http://ypl.uni-graz.at/pages/home.html> oder Yeast GFP Fusion Localization Database, <http://yeastgfp.ucsf.edu>). Längliche, teilweise bananenförmige Strukturen weisen auf ER bzw. ER-Proliferationen (Karmellae) hin. Karmellae sind Stapel Zellkern-assoziiertes ER-Membranen, die bei Überexpression von Proteinen entstehen können (Wright *et al.*, 1988; de Kerchove d'Exaerde *et al.*, 1995; Koning *et al.*, 2002; Natter *et al.*, 2005).

Die ER-Qualitätskontrolle umfasst unter anderem molekulare Chaperone. Proteine, die sich nicht korrekt falten und zusammenzulagern, zeigen oftmals eine verlängerte Assoziation mit diesen Chaperonen, was möglicherweise ebenfalls zu deren Retention im ER beiträgt (Ellegaard *et al.*, 1999; Ellegaard & Helenius, 2003). Vielleicht könnten die Bindungsaffinitäten solcher Chaperone in Hefe sich gegenüber denen im Menschen unterscheiden. Weiterhin könnten Unterschiede in posttranslationalen Modifikationen bei der Reifung von hERG zwischen Hefe und Mensch die Ursache für die fehlerhafte Steuerung der Proteine sein. Z.B. bestehen Unterschiede in der N-gekoppelten Glykosylierung zwischen Hefen und Mammalia (Nakayama *et al.*, 1997, Choi *et al.*, 2003). hERG besitzt zwei Konsensus-Sequenzen für N-gekoppelte Glykosylierung von denen in HEK293-Zellen nur eine glykosyliert wurde (Gong *et al.*, 2002).

Nach Opekarova & Tanner (2003) spielen spezifische Lipide in unmittelbarer Umgebung von Membranproteinen eine wichtige Rolle bei Faltung, Transport, Membrantopologie und Aktivität dieser Proteine. Die Lipidkompositionen in Plasmamembranen weisen zwischen *S. cerevisiae* und Mammalia deutliche Unterschiede auf. Auch die Kulturbedingungen haben bei *S. cerevisiae* einen Einfluss auf die Lipidkomposition (Opekarova & Tanner, 2003). So wäre es denkbar, dass hERG-Untereinheiten für die korrekte Faltung und/oder Zusammenlagerung eine sehr spezifische, in der Hefe nicht gegebene Lipid-Umgebung benötigen und dadurch im Hefesystem von Elementen der Qualitätskontrolle ausgesondert und möglicherweise der Degradation zugeführt werden.

Jahn *et al.* (2002) konnten zeigen, dass erst eine Mutation der H⁺-ATPase AHA2 aus *Arabidopsis thaliana* bei Expression in *S. cerevisiae* a) zu einer Protein-Phosphorylierung und nachfolgenden Interaktion mit dem Regulatorprotein 14-3-3 und b) zu einer Komplementation der disruptierten endogenen H⁺-ATPase Pma1 führte. Nach Kagan *et al.* (2002) interagiert hERG nach PKA-Phosphorylierung ebenfalls mit einem 14-3-3 Protein, was zu einer Modulation der Kanalaktivität führte. Auch wenn in diesem Fall eine generelle Aktivität von hERG nicht von der Bindung von 14-3-3-Proteinen abhängt, wären ähnliche Interaktionen mit regulatorischen Proteinen in Hefe in Abhängigkeit von Protein-Phosphorylierungen möglich.

Für eine erfolgreiche Oberflächenlokalisierung von hERG in Hefe könnten z.B. auch bestimmte notwendige Proteine fehlen, die möglicherweise in Expressionssystemen von höheren Eukaryonten vorhanden sind und dort mit hERG interagieren. So können z.B. in heterologen Expressionssystemen hERG-Untereinheiten mit den (K⁺-Kanal)-β-Untereinheiten MinK, MiRP1 und Hk (letztere aus *Drosophila melanogaster*) assoziieren. Während die Strom-Amplituden von hERG-Kanälen bei Bindung von MinK und Hk deutlich erhöht wurden, war durch Bindung von MiRP1 keine Steigerung der Strom-Amplitude zu beobachten (Wilson *et al.*, 1998; Bauer & Schwarz, 2001; Lu *et al.*, 2003). Ein Einfluss auf den Transport von hERG durch die o.g. β-Untereinheiten wurde zwar nicht explizit beschrieben, deren Koexpression wäre aber als Strategie zum Erreichen einer Oberflächenlokalisierung von hERG in Hefe in Betracht zu ziehen.

Für eine weitergehende Analyse der beobachteten Lokalisation von hERG-Proteinen in der Hefe könnten z. B. folgende Methoden angewandt werden: 1) Eine elektronenmikroskopische Untersuchung bei Immunogold-Färbung von hERG oder GFP, 2) Eine Dichtegradientenzentrifugation gefolgt von SDS-Page und Western-Blot mit entsprechenden für Zellorganellen spezifischen Antikörpern, wie z.B. bei Katzmann *et al.* (1999) beschrieben.

Eine Strategie, um Erkenntnisse darüber zu gewinnen, warum hERG keine Oberflächenlokalisierung im Hefemodell zeigt, wäre die Konstruktion einer Reihe von Deletionsmutanten von hERG. Mit diesem aufwendigen Verfahren könnte nachvollzogen werden, ob und wenn ja, welche Aminosäuresequenzen von hERG einen Transport zur Plasmamembran behindern. Eine weitere Möglichkeit zur Erlangung einer Oberflächenlokalisierung könnte die Herstellung von Proteinchimären

aus hERG einerseits und einem Plasmamembranprotein aus der Hefe andererseits sein.

4.2 Funktionelle Expression von *mKir2.1* in *S. cerevisiae* K⁺-Aufnahme-Mutanten

4.2.1 Untersuchungen bei limitierenden K⁺-Konzentrationen

Die Expression von *mKir2.1* führte in *S. cerevisiae* K⁺-Aufnahme-Mutanten zu einer Komplementation des mutanten Wachstumsphänotyps bei niedrigen K⁺-Konzentrationen in Abhängigkeit vom externen pH (Hasenbrink *et al.*, 2005; Abb. 3.8). GFP-fusioniertes *mKir2.1* zeigte u.a. eine Fluoreszenzverteilung in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran (Abb. 3.3 A und B). Die funktionelle Expression von *mKir2.1* in *S. cerevisiae* K⁺-Aufnahme-Mutanten konnte durch die Verringerung der Sensitivität gegenüber Hygromycin B (Abb. 3.7) und erhöhter Sensitivität gegenüber den spezifischen Inhibitoren Ba²⁺, Cs⁺ und Ag⁺ (Abb. 3.10) sowie 48F10 (Abb. 3.11) bestätigt werden. Der Vergleich der absoluten Werte für die Sensitivität von Kir2.1 vermitteltem Wachstum (EC₅₀-Werte) gegenüber Ba²⁺, Cs⁺ und 48F10 mit denen aus elektrophysiologischen Experimenten (Schram *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2000; Zaks-Makhina *et al.*, 2004) wies gute Übereinstimmungen – zumindest in vergleichbaren Größenordnungen – auf (Hasenbrink *et al.*, 2005). Bei Applikation von Ag⁺ konnte die in elektrophysiologischen Experimenten ermittelte Konzentration für eine vollständige Inhibierung von Kir2.1 (ca. 0,2 µM Ag⁺, Dart *et al.*, 1998 A) durch unsere Ergebnisse (ca. 1 µM Ag⁺, Abb. 3.10) zumindest annähernd nachvollzogen werden.

Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) ist ein Inositolphospholipid, das in kleinen Mengen in der inneren Hälfte der Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran lokalisiert ist (Alberts *et al.*, 2004). Nach van Reenen *et al.* (2005) ist PIP₂ gleichmäßig über die Plasmamembran verteilt und nicht, wie von Pike & Casey, (1996) und Pike & Miller (1998) vorgeschlagen, in Lipid Rafts akkumuliert. Huang *et al.* (1998) beschrieben einen Zusammenhang zwischen der Applikation von PIP₂ und der Aktivierung von Kir2.1 in *Xenopus* Oozyten. Außerdem werden Mutationen in Kir2.1 an Bindestellen für PIP₂ mit dem Andersen Syndrom in Verbindung gebracht

(Donaldson *et al.*, 2003). Al^{3+} kann durch eine hoch affine Bindung mit PIP_2 die Interaktion mit K^+ -Kanälen stören (Hilgemann & Ball, 1996; Huang *et al.*, 1998). Für den in *Xenopus* Oozyten ebenfalls durch PIP_2 aktivierbaren K^+ -Kanal Kir1.1 konnte eine Inhibierung von K^+ -Strömen nach Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Al^{3+} beobachtet werden (Huang *et al.*, 1998). Die Untersuchung einer entsprechenden Zugabe von Al^{3+} auf mKir2.1 vermitteltes Wachstum in der Hefe erbrachte aber keinen Effekt auf mKir2.1. Durch Applikation von Al^{3+} konnte somit kein weiterer Nachweis der Funktionalität von mKir2.1 in *S. cerevisiae* erbracht werden. Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Aktivierung von mKir2.1 durch PIP_2 in der Hefe wäre die Verwendung von PIP_2 -Antikörpern, wie bei (Huang *et al.*, 1998) beschrieben: Die Zugabe von PIP_2 -Antikörpern führte in *Xenopus* Oozyten bei mehreren heterolog exprimierten einwärtsgerichtenden K^+ -Kanälen zu einer Inhibierung von K^+ -Strömen

Zur Entwicklung eines standardisierten Testsystems zur Durchmusterung von Modulatoren von Kir2.1 wurde die Applikation von Cs^+ als zu etablierender Standard ausgewählt: Die inhibitorische Wirkung von Cs^+ auf mKir2.1 vermitteltes Wachstum war bekannt und hinsichtlich der Sensitivität waren *mKir2.1* exprimierende Stämme deutlich von Kontrollstämmen ohne mKir2.1 zu unterscheiden. Eine für ein ‚Screening‘ vorgesehene Methode erfordert entsprechende Validität, Robustheit und eine weitestgehend automatische Datenauswertung. Daher wurden in Zusammenarbeit mit internationalen Partner-Laboratorien Standard-Arbeitsanweisungen (*Standard Operation Procedures*, SOPs) entwickelt. Entsprechend diesen SOPs (siehe Anhang 7.2) wurde die Applikation von Cs^+ auf das Wachstum einer *mKir2.1* exprimierenden Hefemutante (PLY240T-GFP-mKir2.1) und entsprechender Kontrolle (PLY240T-GFP) in einem Ringtest (3 verschiedene Labore) untersucht (Hasenbrink *et al.*, 2007).

Die erhaltenen Ergebnisse (3.2.5) sprechen für die Übertragbarkeit der Testmethode auf andere Laboratorien (Hasenbrink *et al.*, 2007).

Die Testbedingung pH 5,9 und 10 mM KCl wurde ausgewählt, da damit zwei günstige Voraussetzungen für den wachstumsbasierten Substanztest gegeben waren: Die Mutante zeigte ein deutliches Wachstum, was für die Berechnung von zytotoxischen Effekten notwendig war und der Wachstumsvorteil bei Expression von *mKir2.1* gegenüber der Kontrolle (Mutante) war maximal (Abb. 3.8). Dabei ist zu bedenken, dass zu testende Substanzen bei dem in unserem Testsystem

verwendeten pH von 5,9 (ungepuffert) im Vergleich zum physiologischen pH des Menschen von 7,4 (Blut-pH) Unterschiede bezüglich der Protonierung und damit Ladung aufweisen können. Dies könnte Einfluss auf Wechselwirkungen mit dem Kanal und auf einen möglichen Transport durch die Plasmamembran nehmen. Bei einem pH > 5,9 nahm das Wachstum der Mutante zu, bzw. der Wachstumsvorteil bei Expression von *mKir2.1* nahm ab. Für die Wachstumssteigerung der Mutante ist wahrscheinlich der unspezifische Kationen-Kanal NSC1 verantwortlich. NSC1 ist nach Bihler *et al.* (2002) bei saurem pH (pH 4) inaktiv, bei annähernd neutralem pH (pH 7,5) aktiv und kann durch extrazellulär angewandtes Ca^{2+} gehemmt werden. Unter der Annahme, dass NSC1 bei pH 5,9 weniger aktiv ist als bei neutralem pH, wäre bei einem Wechsel auf pH 7 bei der Mutante die Wachstumssteigerung, wie auch die Verringerung der Sensitivität gegenüber Hygromycin B (Abb. 3.17) durch einen verstärkten Einwärtsstrom von K^+ zu erklären. Das in unseren Tests verwendete SDAP-Medium (Rodriguez-Navarro & Ramos, 1984) enthält 0,2 mM Ca^{2+} . Bihler *et al.* (2002) konnten durch ihre Untersuchungen zeigen, dass bei 0,2 mM Ca^{2+} die Ströme über NSC1 auf 35 % der Werte bei 10 nM Ca^{2+} reduziert waren. Eine Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ könnte somit theoretisch das bessere Wachstum der Mutante bei pH 7 wieder reduzieren und somit die Testbedingungen optimieren. Dem steht allerdings entgegen, dass auch Kir2.1 durch extrazelluläres Ca^{2+} im millimolaren Bereich blockiert werden kann (Murata *et al.*, 2002), ein Effekt der sich auch bei unserer *mKir2.1* exprimierenden $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante im millimolaren Bereich abzeichnete (bislang nur mit einem n von 1, ohne Abbildung). Eine schrittweise Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Medium auf Werte bis etwa 1 mM bei gleichzeitiger Anhebung des pH auf 7 (im Sinne einer Anpassung an die physiologischen Bedingungen von Kir2.1 in Maus und Mensch) könnte ein weiterer wichtiger Schritt zur Optimierung der Testbedingungen sein.

4.2.2 Grenzen des Testsystems

Grundsätzliche Grenzen des Assays sind durch Substanzen bestimmt, die unter den Bedingungen des Tests entweder unlöslich oder für die Hefen stark zytotoxisch sind. Ein Beispiel für eine relativ stark zytotoxisch wirkende Substanz ist AgNO_3 . Das Wachstum der $\Delta trk1,2$ und $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante wurde mit EC_{50} -Werten von 1,64 bzw. 1,17 μM AgNO_3 inhibiert (Abb. 3.10). Bei chromosomaler Expression von

mKir2.1 in beiden Mutanten konnten für die Inhibition von *mKir2.1* spezifischem Wachstum EC_{50} -Werte von 0,52 und 0,57 μM ermittelt werden. Bei derart nahe beieinanderliegenden EC_{50} -Werten (*Kir2.1* spezifische Effekte verglichen mit zytotoxischen Effekten) lässt sich nicht vollends ausschließen, dass beide Effekte überlappen und bei der Berechnung von EC_{50} -Werten für die Inhibierung von *mKir2.1* spezifischem Wachstum Anteile des zytotoxischen Effektes mit einfließen. Bei der Lagerung der AgNO_3 -Lösungen musste zudem die Vermeidung einer längeren Licht-Exposition berücksichtigt werden. Andernfalls kann es nach Kierans *et al.* (1991) zu einer Reduktion von Ag^+ zu Ag^0 und zu einer Abnahme der toxischen Wirkung von Silber auf Hefen kommen. Entsprechend nahm die Sensitivität der Hefen, aber auch die Sensitivität von *mKir2.1* vermitteltem Wachstum gegenüber AgNO_3 mit steigender Dauer der Lichteinwirkung auf AgNO_3 -Stammlösungen deutlich ab (ohne Abbildung). Selbstverständlich ist bei Substanzen, deren zytotoxische Wirkung auf die Hefen stärker ist als eine potentielle Wirkung auf *mKir2.1*, eine Aussage zu einem Effekt auf *mKir2.1* unmöglich.

Eine weitere Grenze für das Testsystem ist durch eine Veränderung der Bioverfügbarkeit von Testsubstanzen innerhalb der Testdauer gegeben. Testsubstanzen könnten durch Interaktion mit Medienbestandteilen oder Zellen modifiziert werden oder durch die Zellen aus dem Medium entzogen werden.

Nach Simmons & Singleton (1996) sind *S. cerevisiae*-Stämme in der Lage, eine Reihe von Metallen zu biosorbieren oder bioakkumulieren. Biosorption ist ein Überbegriff für eine Reihe verschiedener chemischer Reaktionen, die zur passiven Anlagerung (Sorption) von Substanzen an biologischen Molekülen (z.B. an Zelloberflächen) führen, als Bioakkumulation bezeichnet man die energieverbrauchende Aufnahme von Substanzen durch lebende Organismen. Beispielsweise können Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ biosorbiert (Blackwell *et al.*, 1995, Simmons & Singleton, 1996; Bustard & McHale, 1998) und Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} bioakkumuliert werden (Norris & Kelly, 1977; Huang *et al.* 1988; Brady & Duncan, 2004). Ag^+ kann sich durch Biosorption in die Zellwand wie auch intrazellulär einlagern (Simmons & Singleton, 1996). Dieser Entzug des Metalls aus dem Medium durch die Zellen führt zu einer verringerten Bioverfügbarkeit im Medium. Je nach Ausmaß der veränderten Bioverfügbarkeit wachsen nachfolgende Zellgenerationen in einer für sie weniger zytotoxischen Umgebung wahrscheinlich mit höheren Wachstumsraten. Als ein Charakteristikum für das Wachstum von Hefen in

Schwermetall-haltigem Medium konnte eine verlängerte lag-Phase beobachtet werden (Ksheminska *et al.*, 2003). Wie in Abb. 4.1 gezeigt, ist bei der *mKir2.1* exprimierenden $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante die Verlängerung der lag-Phase ein wesentlicher Effekt bei steigenden Ag^+ -Konzentrationen. Demgegenüber ging die Applikation von 48F10 in erster Linie mit einer Verringerung der Wachstumsrate und der maximalen optischen Dichte einher. Beide Substanzen wurden als bekannte Inhibitoren von Kir2.1 (Dart *et al.*, 1998 A; Zaks-Makhina *et al.*, 2004) in unserem Hefemodell getestet (Abb. 3.10 und 3.11). Die verlängerte lag-Phase bei $AgNO_3$ -Applikation könnte als Indiz für eine Biosorption des Metalls gewertet werden.

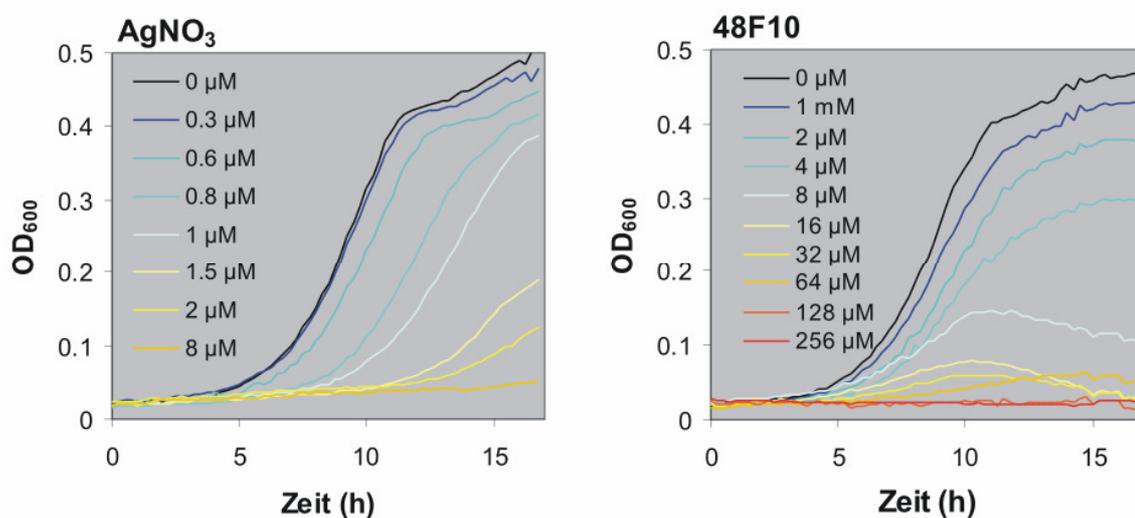


Abb. 4.1: Einfluss von ansteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen $AgNO_3$ und 48F10 auf die Wachstumskurven der *mKir2.1* exprimierenden $\Delta trk1,2$, $tok1$ -Mutante (PLY240T-GFP-*mKir2.1*) bei 10 mM KCl. Während eine ansteigende 48F10-Konzentration insbesondere mit einer geringeren Wachstumsrate und einer geringeren maximalen optischen Dichte einhergeht, fiel bei ansteigender $AgNO_3$ -Konzentration in erster Linie die Verlängerung der lag-Phase als Modifikation der Wachstumskurve ins Gewicht.

Für das wachstumsbasierte Testsystem für eine Durchmusterung potentieller Modulatoren von *mKir2.1* wäre es von großem Vorteil, wenn Substanzen, die *mKir2.1* vermitteltes Wachstum inhibieren, in den gleichen Hefestämmen durch elektrophysiologische Tests auf eine Inhibierung von *mKir2.1* vermittelten K^+ -Strömen hin überprüft werden könnten. Unterschiede in der Wirkung von Substanzen auf die Aktivität von *mKir2.1*, die auf der Verwendung unterschiedlicher Expressionsysteme für den K^+ -Kanal beruhen, könnten somit ausgeschlossen werden. Für die *GFP-mKir2.1* exprimierende $\Delta trk1,2$, $tok1$ -Dreifachmutante

PLY240T-GFP-mKir2.1 wurde in einem Partnerlaboratorium in York (England) durch Dr. Chris Chrotty in elektrophysiologischen Tests versucht, mKir2.1 spezifische Ströme zu detektieren – bislang jedoch ohne Erfolg. Dabei ist anzumerken, dass bis heute keine entsprechende elektrophysiologische Untersuchung an heterolog exprimierten Säuger-K⁺-Kanälen in der Hefe publiziert wurde. Elektrophysiologie wird in *S. cerevisiae* an protoplastierten Zellen vorgenommen (Bertl *et al.*, 1998). Um zu ermitteln, ob möglicherweise die Behandlung zur Protoplastierung der Zellen zu einer Spaltung und somit Inaktivierung des GFP-mKir2.1 Fusionsprotein führte, wurden immuno-Blot-Analysen an protoplastierten Zellen vorgenommen. Jedoch konnte auch für protoplastierte *GFP-mKir2.1* exprimierende Stämme das vollständige Fusionsprotein nachgewiesen werden (Abb. 3.4).

4.2.3 Untersuchungen bei hohen KCl-Konzentrationen

Die Expression von *mKir2.1* in *S. cerevisiae* Mutanten führte bei hohen K⁺-Konzentrationen in Abhängigkeit vom externen pH zu einer Wachstumsinhibierung (Abb. 3.8 und 3.16). Eine derartige Wachstumsinhibierung war bei Expression von nicht-funktionellen mKir2.1-Mutanten R67W und D71V in SDAP-Medium unter gleichen Bedingungen (100 mM KCl und pH 5.9) nicht zu beobachten (Hasenbrink *et al.*, 2005). Darüber hinaus führt nach Kolacna *et al.* (2005) die Expression von *mKir2.1* in K⁺-Efflux defekten *S. cerevisiae* B31-Zellen (Δnha , $\Delta ena1-4$) bei 200 mM KCl bei pH 3 zu keiner, bei pH 5 bzw. pH 7 zu einer deutlichen Wachstumsinhibierung. Ein funktionell vorliegender Kir2.1-Kaliumkanal konnte jeweils als Ursache für die beobachtete Wachstumsinhibierungen festgestellt werden: In $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutanten konnte der Kir2.1 spezifische Wachstumsdefekt durch Applikation von Cs⁺ (Abb. 3.15) und in Δnha , $\Delta ena1-4$ bzw. $\Delta trk1,2$, Δnha , $\Delta ena1-4$ -Zellen (B31, MAB 2d) durch Applikation von Ba²⁺ (Kolacna *et al.*, 2005; Abb. 3.18) aufgehoben werden.

Eine mögliche Schlussfolgerung aus der beobachteten pH-abhängigen Wachstumsinhibierung bei hohen K⁺-Konzentrationen ist eine pH-Abhängigkeit der Aktivität von mKir2.1 in den Hefezellen. Sabirov *et al.* (1997) konnten zeigen, dass die Aktivität von Kir2.1 in *Xenopus*-Oozyten bei schrittweiser Senkung des pH_a von pH 7,4 bis 2 zunehmend inhibiert wird. Allerdings war eine vollständige Einstellung

der Aktivität auch bei pH 2 nicht zu verzeichnen, was in der Hefe durch den fehlenden Kir2.1 spezifischen Wachstumsphänotyp a) bei pH 4 in $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutanten (Abb. 3.8) und b) bei pH 3 und 200 mM KCl in B31-Zellen (Kolacna *et al.*, 2005) nicht bestätigt wurde. Wie in Abb. 3.8 gezeigt, scheint der extrazelluläre pH in einem pH-Bereich von 4-7 bei der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Mutante in ungepuffertem Medium weder Einfluss auf die Intensität des Fluoreszenzsignals von GFP-mKir2.1 noch auf dessen Fluoreszenzmuster zu haben. Dies spricht für eine pH_a -unabhängige konstante Expression von *mKir2.1*.

Eine mögliche Ursache für den beobachteten Phänotyp ist die durch mKir2.1 verursachte Akkumulation von K^+ in der Hefe bis hin zu toxischen Konzentrationen. Der optimale intrazelluläre K^+ -Gehalt liegt bei 200-300 mM (Rodriguez-Navarro, 2000) und ein Überschuss an intrazellulärem K^+ kann durch die K^+ -Efflux-Systeme Nha1p und Ena1p eliminiert werden (Banuelos *et al.*, 1998). In $\Delta nha1$, $\Delta ena1-4$ -Mutanten (B31 Zellen) führte die Expression von *mKir2.1* in YNB-Medium bei pH 3, 5 und 7 zu einer deutlichen Erhöhung der intrazellulären K^+ -Konzentration (Kolacna *et al.*, 2005). Aber auch bei funktionellen K^+ -Efflux-Systemen konnte in der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Dreifachmutante bei Expression von *mKir2.1* eine Tendenz zu einem höheren intrazellulären Kaliumgehalt ($[K]_i$) bei pH_a 5,9 und 6,5, jeweils bei 10 bzw. 50 mM extrazellulärem K^+ , gezeigt werden (Hasenbrink *et al.*, 2005). Eine Wiederholung dieser Experimente mit mehr und/oder größeren pH_a - bzw. $[K^+]_a$ -Schritten könnte zudem deutlicher machen, inwieweit durch Anhebung von pH_a und $[K^+]_a$ der Überschuss an $[K]_i$ bei Expression von *mKir2.1* gegenüber der Kontrolle erhöht wird. Der WT-Stamm sollte dabei jeweils als zweite Kontrolle untersucht werden, zumal der $[K]_i$ beim *mKir2.1* exprimierendem Stamm den Wert des WT übersteigen sollte, um eine toxische Wirkung eines durch Kir2.1 stark erhöhten $[K^+]_i$ plausibel begründen zu können.

Als weitere Ursache für den beobachteten Phänotyp von *mKir2.1* exprimierenden $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Dreifachmutanten bei hohen $[K^+]_a$ und pH 7 käme eine Depolarisation der Plasmamembran, bedingt durch den verstärkten K^+ -Influx über mKir2.1, in Frage. Z.B. könnten Transportprozesse über der Plasmamembran, die durch das Membranpotential energetisiert werden (siehe z.B.: Serrano, 1991; van der Rest *et al.*, 1995) durch eine Depolarisierung der Plasmamembran beeinträchtigt werden. Eine direkte Messung des Membranpotentials mit elektrophysiologischen Methoden

konnte bei *mKir2.1* exprimierenden Zellen bislang nicht vorgenommen werden. Schwankungen des Membranpotentials können allerdings indirekt über Indikatoren wie z.B. das kationische Antibiotikum Hygromycin B (Perlin *et al.*, 1988; Madrid *et al.*, 1998; Navarre & Goffeau, 2000; Mercier *et al.*, 2004) oder den Fluoreszenzfarbstoff diS-C₃(3) (Gaskova *et al.*, 1998; Gaskova *et al.*, 2001) erfasst werden.

Bei 100 mM KCl_a war bei Expression von *mKir2.1* in der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Dreifachmutante bei pH 5,9 in ungepuffertem und gepuffertem Medium sowie bei pH 7 in gepuffertem Medium eine deutliche Abschwächung der Sensitivität gegenüber Hygromycin B zu erkennen (Abb. 3.17). Die hierbei ermittelten hohen EC₅₀-Werte lassen jeweils auf eine Depolarisation der Plasmamembran schließen. Verglichen mit dem Wildtyp wies der *mKir2.1* exprimierende Stamm darüber hinaus in gepuffertem Medium bei pH 5,9 und 7 leicht höhere EC₅₀-Werte für Hygromycin B auf (Abb. 3.17). Unter eben diesen Wachstumsbedingungen wurde bei demselben Stamm eine deutliche Wachstumsinhibierung beobachtet (Abb. 3.16). Eine Membranpotential-abhängige Wachstumsinhibierung wäre aber nur dann zu erklären, wenn es einen Schwellenwert der Membrandepolarisation gibt, von dem aus in Richtung positiverer Werte es rasch zu einer deutlichen Wachstumsinhibierung kommt, und man annimmt, dass unter den Bedingungen (pH_a 5,9 und pH_a 7, jeweils gepuffert) der *mKir2.1* exprimierende Stamm diesen Wert überschreitet. Die leicht abnehmende Sensitivität der *mKir2.1* exprimierenden Mutante von pH 5,9 ungepuffert, über pH 5,9 gepuffert zu pH 7 gepuffert kann eine Verstärkung der Membrandepolarisation entlang einer mit steigendem pH_a ansteigenden Aktivität von Kir2.1 (siehe oben) zum Ausdruck bringen. Hierbei sei angemerkt, dass in ungepuffertem Medium die Aktivität der Plasmamembran-ATPase Pma1p das Medium für gewöhnlich stark ansäuert (Perlin *et al.*, 1988). In ungepufferten Medien mit pH 5,9 sank der externe pH_a nach 12,5 h Testdauer auf 3,9, während bei Pufferung mit 20 mM MES der pH_a lediglich um 0,2 pH-Einheiten auf 5,7 sank. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass das ohnehin schwache Wachstum bei pH 7 (Abb. 3.15 und 3.16) die Ermittlung hinreichend genauer EC₅₀-Werte für Hygromycin B erschwert.

Im Labor von Prof. Dana Gaskova (Prag) wurde der Einfluss der Expression von *mKir2.1* in der $\Delta trk1,2$, $\Delta tok1$ -Dreifachmutante bzw. der $\Delta trk1,2$ -Doppelmutante auf das Membranpotential bei externem pH 5,9 und 7 (beides gepuffert) und 100 mM KCl_a mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs diS-C₃(3) untersucht. Der Stamm, mit dem

gezeigt wurde, dass bei Applikation von Hygromycin B die Expression von *mKir2.1* in der Mutante zu einer deutlichen Verringerung der Sensitivität gegenüber dem Antibiotikum bei pH_a 5,9 und 7 (beides gepuffert) und 100 mM KCl_a führte (Abb. 3.17), zeigte bei der Untersuchung mit $\text{diS-C}_3(3)$ keine vergleichbaren Anzeichen einer Depolarisation. Auch zwei weitere *mKir2.1* exprimierende K^+ -Aufnahme-Mutanten PLY240L-GFP-*mKir2.1* und PLY240 [pYEX-GFP-*mKir2.1*] wiesen fast keine Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollen ohne *mKir2.1* auf. Lediglich bei dem *mKir2.1* episomal exprimierenden Stamm PLY240 [pYEX-GFP-*mKir2.1*] waren in einem Experiment Anzeichen einer leichten Membrandepolarisation gegenüber der Kontrolle PLY240 [pYEX-GFP] zu beobachten. Bei dem WT-Stamm PLY232 konnten allerdings in allen Untersuchungen mit $\text{diS-C}_3(3)$ deutliche Anzeichen einer Membrandepolarisation gegenüber den K^+ -Aufnahme-Mutanten beobachtet werden; dies spricht für die methodische Durchführung. Zu prüfen wäre noch, ob die Aktivität von *mKir2.1* durch Komponenten des $\text{diS-C}_3(3)$ -Testansatzes inhibiert werden kann, was die Aussage zur Modulierung der Membranspannung durch *mKir2.1* verfälschen würde.

Durch die hier vorgenommenen Untersuchungen konnte die Ursache des Phänotyps bei hohen $[\text{KCl}]_a$ und pH 7 bisher nicht eindeutig aufgeklärt werden.

4.2.4 Pharma-/Toxikologie bei hohen K^+ -Konzentrationen

Kolacna *et al.* (2005) konnten zeigen, dass bei Expression von *mKir2.1* in *S. cerevisiae* K^+ -Efflux defizienten Stämmen und Wachstum bei hohen $[\text{KCl}]_a$ der heterologe Kaliumkanal pharma-/toxikologisch untersucht werden kann – in diesem Fall durch Applikation des *Kir2.1*-Blockers Ba^{2+} . Bei 150 mM KCl_a wurden hierbei *mKir2.1* vermittelte Wachstumsinhibierungen durch Zugabe von Ba^{2+} mit EC_{50} -Werten von ca. 500 μM aufgehoben (Abb. 3.18). Zum Vergleich: Mit deutlich höherer Sensitivität gegenüber Ba^{2+} ($\text{EC}_{50} = 2.3 \mu\text{M}$) wurde *mKir2.1* vermitteltes Wachstum bei 10 mM KCl $\Delta\text{trk1,2}$, Δtok1 -Dreifachmutante inhibiert. Darüber hinaus kann die *mKir2.1* spezifische Wachstumshemmung der $\Delta\text{trk1,2}$, Δtok1 -Dreifachmutante bei 100 mM KCl_a durch den spezifischen Inhibitor Cs^+ mit deutlich höheren EC_{50} -Werten (571 μM bei pH 5.9 und 335 μM bei pH 7, Abb. 3.15) im Vergleich zu *mKir2.1* spezifischen Effekten bei 10 mM KCl (EC_{50} : 70 μM bei pH 5.9, Abb. 3.10)

aufgehoben werden. Owen *et al.* (1999) berichteten ebenfalls über eine deutliche Steigerung der Sensitivität von mKir2.1 vermittelten Strömen in *Xenopus* Oozyten gegenüber Ba²⁺ bei Verringerung der [K⁺]_a von 90 mM auf 10 mM. Nach Thompson *et al.* (2000) blockiert Cs⁺ den K⁺-Kanal Kir2.1 durch Interaktion mit den Aminosäureresten Ser165 und im geringeren Maße Thr141. Fujiwara & Kubo (2002) schlagen vor, dass Ser165 unterhalb des Selektivitätsfilters, also in Richtung Zellinneres, die engste Stelle der Pore bildet und Cs⁺ hier die Pore verstopft. Ähnliches wäre dann auch für die Kir2.1-Blocker Ag⁺ und Ba²⁺ zu erwarten: Der Aminosäurerest Cys149 scheint bei Ag⁺ und Thr141 bei Ba²⁺ eine wesentliche Rolle bei der Blockade von Kir2.1 zu spielen und beide Reste liegen jeweils innerhalb der Kanalpore (Dart *et al.*, 1998 A; Dart *et al.*, 1998 B, Alagem *et al.*, 2001). Ein weiterer Aminosäurerest Glu125 in der extrazellulären Schleife vor der Porenregion ist ebenfalls an der Blockade von Kir2.1 durch Ba²⁺ beteiligt (Alagem *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2002). Wahrscheinlich ist die Kompetition um den Eintritt in die Kanalpore der wesentlich Grund für die bei höheren [KCl]_a deutlich höheren EC₅₀-Werte für eine mKir2.1-Blockade durch Cs⁺- oder Ba²⁺-Ionen. Somit besteht bei höheren [KCl]_a bei der Untersuchung des Einflusses derartiger Ionen auf mKir2.1 durch die geringere Sensitivität ein Nachteil für das Testsystem. Bei Applikation von organischen Substanzen jedoch, muss eine erhöhte [K⁺]_a nicht mit einer Reduzierung der Sensitivität einhergehen.

Ein Vorteil eines Testansatzes bei 100 mM KCl wäre, dass die K⁺-Aufnahme-Mutante bei nicht-limitierenden [K⁺]_a ein mit dem Wildtyp annähernd vergleichbares, gutes Wachstum aufweist (Abb. 3.8). Somit lassen sich bei Applikation von potentiellen K⁺-Kanal-Modulatoren genauere Inhibierungskinetiken durch zytotoxische Effekte und entsprechende EC₅₀-Werte ermitteln als bei 10 mM KCl. Bei Expression von *mKir2.1* wurde insbesondere bei pH 7 (gepuffert) und 100 mM KCl eine sehr deutliche Wachstumsinhibierung beobachtet (vergleiche Abb. 3.15 und 3.16). Dieser mKir2.1 spezifische Phänotyp eignet sich aufgrund der deutlichen Unterscheidbarkeit vom mutanten Phänotyp voraussichtlich ähnlich gut für die Erstellung von Inhibierungskinetiken bei der Applikation von Testsubstanzen wie der bei pH 5,9 und 10 mM KCl. Eine Untersuchung der Funktion von Kir2.1 bei pH 7 hätte auch den Vorteil, dass die pH-Bedingungen sich dem physiologischen pH (pH 7,4 im Blut des Menschen) und dem Aktivitätsmaximum von Kir2.1 annähert. Ein möglicher Nachteil dieses Testsystems wäre die gegenüber einer Säugerzelle ungewöhnlich hohe [K⁺]_a.

4.2.4 Lokalisation von mKir2.1 in *S. cerevisiae*

Bei fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung zur Lokalisation von GFP-mKir2.1 Fusionsproteinen konnten GFP-Signale um eine intrazelluläre Struktur (vermutlich Zellkern) und in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran detektiert werden (Abb. 3.3 A und B). Das GFP-Fluoreszenzmuster in Plasmamembrannähe war nicht von demjenigen GFP-fusionierter endogener Trk1- bzw. Trk2-Transporter der Hefepiasmamembran zu unterscheiden (Abb. 3.3 A-D). Allerdings zeigte die Lokalisation von GFP-mKir2.1 auch deutliche Überlappungen mit dem ER-Marker sig/mRFP/HDEL (Abb. 3.3 E; Schwarzer, 2006). Mehrere Arbeitsgruppen berichten von einer Retardierung eines Großteils heterologer Membranproteine aus Pflanzen und Säugern in intrazellulären Strukturen (wahrscheinlich im ER) der Hefe (Villalba *et al.*, 1992 ; Regenberg *et al.*, 1995; Kasahara & Kasahara, 1997; Prinz *et al.*, 2003). Da das ER in *S. cerevisiae* neben ringförmigen Strukturen um den Zellkern auch nahezu ringförmige Strukturen unmittelbar unterhalb der Plasmamembran ausbildet (Abb. 4.2) ist nicht auszuschließen, dass auch in unserem Fall zumindest ein wesentlicher Teil des GFP-mKir2.1-Proteins im ER lokalisiert ist.

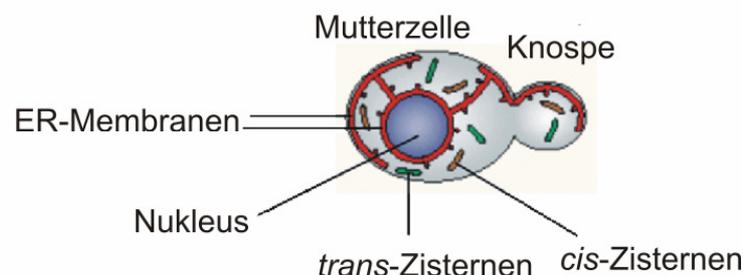


Abb. 4.2 Verteilung des ER in *S. cerevisiae*. Schematische Verteilung des ER in *S. cerevisiae* (nach Glick, 2002)

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob mKir2.1 in Lipid Rafts lokalisiert ist. Als „Lipid Rafts“ werden Mikrodomänen in der Membran bezeichnet, die mit Cholesterol und Glycosphingolipiden angereichert sind. Sie wurden mit verschiedenen Prozessen wie Signaltransduktion, Endozytose und Cholesterin-Trafficking in Verbindung gebracht (Pike, 2004). Lipid Rafts unterscheiden sich von anderen Anteilen der Membran durch ihre Unlöslichkeit in nicht-ionischen

Detergenzien wie Triton X-100 und zeigen somit bei der Auftrennung im Dichtegradienten eine niedrige Dichte (Chamberlain, 2004). Allerdings muss erwähnt werden, dass es keinen klaren Konsens über Größe, Lebensdauer, Cholesterin-Abhängigkeit und sogar Existenz von Lipid Rafts gibt (van Reenen *et al.*, 2005). Im Zusammenhang mit Lipid Rafts wird deshalb auch häufig lediglich von DRMs (*detergent resistant membranes*) gesprochen (Grossmann *et al.*, 2006). Romanenko *et al.* (2004) konnten zeigen, dass Kir2.1 fast ausschließlich in Triton X-100 unlöslichen Membranfraktionen zu detektieren war, woraus sie schlussfolgerten, dass Kir2.1 in Lipid Rafts lokalisiert ist. Das punktförmige Fluoreszenzmuster von GFP-mKir2.1 in der Nähe der Plasmamembran (Abb. 3.3 A) könnte auch auf eine Lokalisation von mKir2.1 in Lipid Rafts der Plasmamembran hindeuten. In Verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch in der Hefe einige endogene wie auch heterolog exprimierte Plasmamembranproteine in Lipid Rafts organisiert sind (Bagnat *et al.*, 2000; Bagnat *et al.*, 2001; Malinska *et al.*, 2003; Malinska *et al.*, 2004; Opekarova *et al.*, 2005; Yenush *et al.*, 2005; Grossmann *et al.*, 2006). Für die Fluorophor-fusionierten endogenen Plasmamembranproteine Can1p, Sur7p, Fur4p und das heterolog exprimierte GFP-HUP1 konnte die Organisation in Lipid Rafts nachgewiesen werden, sowie ein punktförmiges GFP-Fluoreszenzmuster am Zellrand gezeigt werden (Malinska *et al.*, 2003; Malinska *et al.*, 2004; Grossmann *et al.*, 2006).

Die Anfärbung mit dem Lipid Rafts-Farbstoff Alexa Fluor 594 CTx-B führte, von sehr seltenen (ca. 1 Zelle unter 1000) Ausnahmen abgesehen, zu keinem Signal (Abb. 3.5 Aa und Ac). Da die Zellwand als potentielle Barriere für den Farbstoff durch die analoge Untersuchung von protoplastierten Zellen ausgeschlossen werden konnte (Abb. 3.5 Ac), ist ein Fehlen der Zielmoleküle des Fluoreszenzfarbstoffs (GM1-Ganglioside) in *S. cerevisiae* als Ursache für das fehlende Signal in Betracht zu ziehen. Der Farbstoff Filipin bindet an 3 β -hydroxy-Sterole und kann zur Anfärbung von Cholesterol (Norman *et al.*, 1972) wie auch Ergosterol, dem in *S. cerevisiae* vorwiegenden Sterol, verwendet werden (Bagnat & Simons, 2002). Ergosterol wird auf ähnliche Art und Weise synthetisiert, verestert, verwendet und reguliert wie Cholesterol in Säugetieren (Sturley, 2000). Da Ergosterol in Lipid Rafts in *S. cerevisiae* stark angereichert ist (Bagnat *et al.*, 2000), wurde durch Anfärbung mit Filipin versucht, Lipid Rafts in dem *mKir2.1* exprimierenden Stamm PLY240T-GFP-mKir2.1 zu lokalisieren. Das fluoreszenzmikroskopische Bild zeigte allerdings nicht

wie bei Grossmann *et al.* (2007) ein punktförmiges Filipin-Fluoreszenzmuster am Rande der Zellen, sondern durchgehende ringförmige Strukturen rund um die Zellen (Abb. 3.5 B), was keine Rückschlüsse auf die Lokalisation von Lipid Rafts zulässt.

Die unmittelbare Nähe von plasmamembranständigen Signalen von GFP-Trk1, GFP-Trk2 (Abb. 3.3 C,D), Filipin (Abb. 3.5 B) und FM4-64 (Abb. 3.5 C) einerseits und GFP-mKir2.1-Signalen in der Zellperipherie andererseits (Abb. 3.3, Abb. 3.5) deutet zwar die Möglichkeit einer übereinstimmenden Lokalisation in der Plasmamembran an, schließt aber eine weitgehende Lokalisation von mKir2.1 im peripheren ER nicht aus. Der Abstand zwischen peripherem ER und Plasmamembran kann deutlich weniger als die maximale lichtmikroskopische Auflösung von 0,2 μm (STED-Mikroskope ausgenommen) betragen (Pichler *et al.*, 2001), womit eine Unterscheidung zwischen peripherem ER und Plasmamembran im herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop kaum möglich ist. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung mit Immunogold-Färbung mit entsprechenden Gold-markierten anti-GFP- oder anti-Kir2.1-Antikörpern könnte zumindest die Lokalisation in der Plasmamembran bestätigen. Eine Lokalisation von GFP-mKir2.1 in Lipid-Rafts könnte, wie durch Anwendung von Alexa Fluor 594 CTx-B und Filipin angestrebt (siehe oben), durch weitgehende Kolo­kalisation von punktförmigen Fluoreszenzsignalen von Lipid Raft Markern einerseits und GFP-mKir2.1 andererseits bestätigt werden. Die Verwendung von Fluorophor-markierten, bekannten Lipid-Raft Proteinen aus *S. cerevisiae* bietet eine Alternative zur Verwendung der o.g. Fluoreszenzfarbstoffe. Z.B. sind Can1p und Pma1p in distinkten Lipid-Rafts-Membrandomänen lokalisiert (Malinska *et al.*, 2003). Durch Untersuchung der Kolo­kalisation von GFP-mKir2.1 und (z.B.) mRFP fusioniertem Can1p oder Pma1p könnte GFP-mKir2.1 unter Umständen einer bestimmten Gruppierung von Lipid-Rafts-Membrandomänen zugeordnet werden.

Hierbei empfiehlt sich die Verwendung eines konfokalen Mikroskops, um Überlagerungen mit Signalen, die nicht in der Focus-Ebene lokalisiert sind, zu vermeiden; so können wesentlich distinktere Signale erhalten werden.

Alternativ zu den optischen Methoden könnten durch Isolierung der Triton X-100 unlöslichen Membranfraktion und immuno-Westernblot, wie z.B. bei Bagnat *et al.*

(2000) beschrieben, eine Kokalisation von GFP-mKir2.1 mit bekannten Lipid Rafts Proteinen untersucht werden.

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob durch Applikation von Lipid-Rafts-Modulatoren ein Effekt auf das durch mKir2.1 vermittelte Wachstum erzielt werden konnte. Die Zugabe von Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD), einem Modulator von Lipid Rafts-Proteinen in Säugerzellen (Pike & Miller, 1998; Furushi & Anderson, 1998; Gomez-Mouton *et al.*, 2001), zum Medium führte jedoch zu keinem Effekt auf das Wachstum (Abb. 3.6). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass eine Cholesterin-Verarmung durch Zugabe von M β CD nicht bei allen Lipid Rafts-Proteinen zu einer Delokalisierung führt: Hansen *et al.* (2001) konnten für das Lipid Rafts Protein Galektin-4 in Schweine-Enterozyten keine Delokalisierung nach entsprechender Zugabe von M β CD feststellen. Neben M β CD kann auch Cyclodextrin (CD) eine Cholesterol-Verarmung in Säugerzellen bewirken (Furuchi & Anderson, 1998). Inwieweit Carboxymethyl- β -Cylcodextrin (CM β CD) zur Cholesterol- bzw. Ergosterol-Verarmung von Zellen verwendet werden kann, ist in der Literatur zwar nicht beschrieben, könnte aber aufgrund der Strukturähnlichkeit zu M β CD und CD durchaus möglich sein. Auch die Zugabe von CM β CD führte zu keinem Effekt auf das Wachstum von *mKir2.1* exprimierenden Zellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Lokalisation in der Plasmamembran wahrscheinlich ist, zumal die von einer Integration in die Plasmamembran abhängige Funktionalität von mKir2.1 nachgewiesen wurde und GFP-mKir2.1 im fluoreszenzmikroskopische Bild eine ringförmige Struktur um die Zellen ausbildet. Ein Lokalisation in Lipid-Rafts kann jedoch nicht abschließend beurteilt werden.

5 Zusammenfassung

Die humanen Kaliumkanäle hERG und Kir2.1 tragen wesentlich zur Repolarisierung des kardialen Membranpotentials bei (Sanguinetti *et al.*, 1995; Wible *et al.*, 1995). Fehlfunktionen in diesen Kanälen können zu einer Verzögerung der kardialen Repolarisation, einer Verlängerung des QT-Intervalls im Oberflächen-EKG und zu lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen führen (Tristani-Firouzi *et al.*, 2002; Sanguinetti & Tristani-Firouzi, 2006).

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung von hERG und dem zum humanen Kir2.1-Protein orthologen Kir2.1-Protein aus der Maus in *Saccharomyces cerevisiae* K⁺-Transportmutanten. Die funktionelle Expression von chromosomal als auch episomal exprimierter *mKir2.1*-cDNA komplementierte den mutanten Wachstumsphänotyp unter nicht permissiven Bedingungen (3-10 mM KCl) in Abhängigkeit vom externen pH. GFP-mKir2.1 Fusionsproteine konnten in der Plasmamembran oder zumindest in unmittelbarer Nähe zu dieser lokalisiert werden. Unter nicht permissiven (20 mM KCl) wie auch permissiven Bedingungen (100 mM KCl) zeigten *mKir2.1* exprimierende Zellen, verglichen mit einem Kontrollstamm ohne *mKir2.1*, eine deutlich verringerte Sensitivität gegenüber dem als Indikator für das Membranpotential beschriebenen Antibiotikum Hygromycin B, was auf eine Membrandepolarisierung mit funktionellem mKir2.1 hindeutet. Die Untersuchung des Wachstums von *mKir2.1* exprimierenden Stämmen bei Zugabe der bekannten Blocker von Kir2.1 Ag⁺, Cs⁺, Ba²⁺ und 48F10 zeigte unter K⁺-limitierenden Bedingungen eine signifikante Inhibierung von mKir2.1 spezifischem Wachstum. Im Zuge der Entwicklung eines standardisierten Testsystems zur Durchmusterung von potentiellen Modulatoren von Kir2.1 wurde in einem Ringtest die Übertragbarkeit dieser Wachstumstests auf andere Labore am Beispiel eines standardisierten CsCl-Test untersucht und bestätigt. Unter permissiven Bedingungen (≥ 50 mM KCl) und pH 7 führte darüber hinaus die Expression von *mKir2.1* zu einer signifikanten Wachstumsinhibierung und damit zu einem weiteren mKir2.1 spezifischen Phänotyp. Diese Wachstumsinhibierung konnte durch Zugabe von CsCl und in K⁺-Effluxmutanten durch Zugabe von BaCl₂ aufgehoben werden.

Damit konnte für diesen K⁺-Kanal die funktionelle heterologe Expression gezeigt werden und es wurden zwei neue, bisher nicht beschriebene Phänotypen identifiziert. Mit den konstruierten Hefestämmen steht ein pharma-/toxikologisches

Testsystem zur Verfügung, für das die Sensitivität, Spezifität und der Vergleich mit dem ‚Gold Standard‘ unter standardisierten Bedingungen gezeigt werden konnte.

Die Expression von *HERG*-cDNA führte in *S. cerevisiae* K⁺-Aufnahmemutanten zu keiner Komplementation des mutanten Wachstumsphänotyps. Bei der Expression von Fusionskonstrukten aus *GFP* und *HERG* konnte keine Lokalisation an der Zelloberfläche beobachtet werden. Auch die Konstruktion verschiedener *HERG*-Modifikationen im Sinne eines verbesserten Membran- ‚Targeting‘ und/oder verbessertem ER-Exports konnten keine Lokalisierung in oder in der Nähe der Plasmamembran sowie keine erfolgreiche Komplementation bewirken.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA (1999). MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* **97**(2),175-87.
- Ai T, Fujiwara Y, Tsuji K, Otani H, Nakano S, Kubo Y, Horie M. (2002). Novel KCNJ2 mutation in familial periodic paralysis with ventricular dysrhythmia. *Circulation* **105**, 2592-4.[
- Alagem N, Dvir M, Reuveny E (2001). Mechanism of Ba²⁺ block of a mouse inwardly rectifying K⁺ channel: differential contribution by two discrete residues. *J Physiol* **534**, 381-93.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004) Molekularbiologie der Zelle, 4. Ausgabe, Wiley-VCH, Weinheim
- Andersen ED, Krasilnikoff PA, Overvad H (1971). Intermittent muscular weakness, extrasystoles, and multiple developmental anomalies. A new syndrome? *Acta Paediatr Scand* **60**, 559-64.
- Anderson JA, Nakamura RL, Gaber RF (1994). Heterologous expression of K⁺ channels in *Saccharomyces cerevisiae*: strategies for molecular analysis of structure and function. *Symp Soc Exp Biol* **48**, 85-97.
- Armstrong CM und Hille B (1998) Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* **20**, 371-80.
- Arvan P, Zhao X, Ramos (2002). Secretory pathway quality control operating in Golgi, plasmalemmal, and endosomal systems. *Traffic* **3**, 771-80
- Ayllon V, Fleischer A, Cayla X, Garcia A, Rebollo A (2002). Segregation of Bad from lipid rafts is implicated in the induction of apoptosis. *J Immunol* **168**, 3387-93.
- Bagnat M and Simons K (2002). Cell surface polarization during yeast mating. *PNAS* **99**, 14183-8.
- Bagnat M, Chang A, Simons K (2001). Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast. *Mol Biol Cell* **12**, 4129-38.
- Bagnat M, Keranen S, Shevchenko A, Shevchenko A, Simons K (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *PNAS* **97**, 3254-9.
- Ballester LY, Benson DW, Wong B, Law IH, Mathews KD, Vanoye CG, George AL Jr (2006). Trafficking-competent and trafficking-defective KCNJ2 mutations in Andersen syndrome. *Hum Mutat* **27**, 388.
- Banuelos MA, Sychrova H, Bleykasten-Grosshans C, Souciet JL, Potier S (1998). The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144**, 2749-58.
- Barlowe C (2003). Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol* **13**, 295-300.
- Barrett-Jolley R, Dart C, Standen NB (1999). Direct block of native and cloned (Kir2.1) inward rectifier K⁺ channels by chloroethylclonidine. *Br J Pharmacol* **128**, 760-6.

- Bauer CK, Schwarz JR (2001). Physiology of EAG K⁺ channels. *J Membr Biol* **182**, 1-15.
- Baumann NA, Sullivan DP, Ohvo-Rekila H, Simonot C, Pottekat A, Klaassen Z, Beh CT, Menon AK (2005). Transport of newly synthesized sterol to the sterol-enriched plasma membrane occurs via nonvesicular equilibration. *Biochemistry* **44**, 5816-26.
- Bebök Z, Venglarik CJ, Panczel Z, Jilling T, Kirk KL and Sorscher EJ (1998). Activation of F508 CFTR in an epithelial monolayer. *Am J Physiol* **275**, 599–607.
- Becker D, Geiger D, Dunkel M, Roller A, Bertl A, Latz A, Carpaneto A, Dietrich P, Roelfsema MR, Voelker C, Schmidt D, Mueller-Roeber B, Czempinski K, Hedrich R (2005). AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner. *PNAS* **101**, 15621-6.
- Bertl A, Anderson JA, Slayman CL, Gaber RF (1995). Use of *Saccharomyces cerevisiae* for patch-clamp analysis of heterologous membrane proteins: characterization of Kat1, an inward-rectifying K⁺ channel from Arabidopsis thaliana, and comparison with endogeneous yeast channels and carriers. *PNAS* **92**, 2701-5.
- Bertl A, Bihler H, Kettner C, Slayman CL (1998). Electrophysiology in the eukaryotic model cell *Saccharomyces cerevisiae*. *Pflugers Arch* **436**, 999-1013.
- Bertl A, Ramos J, Ludwig J, Lichtenberg-Fraté H, Reid J, Bihler H, Calero F, Martínez P and Ljungdahl PO (2003). Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol Microbiol* **47(3)**, 767–80.
- Bezanilla F and Armstrong CM (1977). Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J Gen Physiol* **70**, 549–66.
- Bichet D, Haass FA and Jan LY (2003). Merging functional studies with structures of inward rectifier K⁺ channels. *Nat Rev Neurosci* **4**, 957-67.
- Bichet D, Lin Y-F, Ibarra CA, Huang CS, Yi BA, Jan YN, and Jan LY (2004). Evolving potassium channels by means of yeast selection reveals structural elements important for selectivity. *PNAS* **101**, 4441–6.
- Bihler H, Slayman CL, Bertl A (1998). NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **432**, 59-64.
- Bihler H, Slayman CL, Bertl A. (2002). Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim Biophys Acta.* **1558**, 109-18.
- Birnboim H and Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc Acids Res* **7**, 1513.
- Blackwell KJ, Singleton I, Tobin JM (1995). Metal cation uptake by yeast: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**, 579-84.
- Bradford, M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brady D, Duncan JR (1994). Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**, 149-54.

- Bröker, M. (1993). Rapid transformation of cryopreserved competent *Schizosaccharomyces pombe* cells. *BioTechniques* **15**, 599–600.
- Bustard and McHale (1998) Biosorption of heavy metals by distillery-derived biomass. *Bioproc Eng* **19**, 351-3.
- Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (2002), A monomeric red fluorescent protein. *PNAS* **99**, 7877–82.
- Chamberlain LH (2004). Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS Lett* **559**, 1-5.
- Cheng CS, Alderman D, Kwash J, Dessaint J, Patel R, Lescoe MK, Kinrade MB, Yu W (2002). A high-throughput HERG potassium channel function assay: an old assay with a new look. *Drug Dev Ind Pharm* **28**, 177-91.
- Chilton L and Loutzenhiser (2001). Functional evidence for an inward rectifier potassium current in rat renal afferent arterioles. *Circ Res.* **88**,152-8.
- Chiu PJ, Marcoe KF, Bounds SE, Lin CH, Feng JJ, Lin A, Cheng FC, Crumb WJ, Mitchell R (2004). Validation of a [³H]astemizole binding assay in HEK293 cells expressing HERG K⁺ channels. *J Pharmacol Sci* **95**, 311-9.
- Choe S (2002). Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* **3**, 115-21.
- Choi BK, Bobrowicz P, Davidson RC, Hamilton SR, Kung DH, Li H, Miele RG, Nett JH, Wildt S, Gerngross TU (2003). Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *PNAS* **100**, 5022-7
- Choo-Kang LR and Zeitlin PL (2001). Induction of HSP70 promotes ΔF508 CFTR trafficking. *Am J Physiol* **281**, L58–L68.
- Chrissobolis S and Sobey CG (2003). Inwardly rectifying potassium channels in the regulation of vascular tone. *Curr Drug Targets* **4**, 281-9.
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33-8.
- Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* **80**, 795-803.
- Dart C and Leyland ML (2001). Targeting of an A Kinase-anchoring protein, AKAP79, to an inwardly rectifying potassium channel, Kir2.1. *J Biol Chem* **276**, 20499-505.
- Dart C, Leyland ML, Barrett-Jolley R, Shelton PA, Spencer PJ, Conley EC, Sutcliffe MJ, Stanfield PR (1998 A). The dependence of Ag⁺ block of a potassium channel, murine Kir2.1, on a cysteine residue in the selectivity filter. *J Physiol* **511**, 15-24.
- Dart C, Leyland ML, Spencer PJ, Stanfield PR, Sutcliffe MJ (1998 B). The selectivity filter of a potassium channel, murine kir2.1, investigated using scanning cysteine mutagenesis. *J Physiol* **511**, 25-32.
- de Kerchove d'Exaerde A, Supply P, Dufour JP, Bogaerts P, Thines D, Goffeau A, Boutry M (1995). Functional complementation of a null mutation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H⁺-ATPase by a plant H⁺-ATPase gene. *J Biol Chem* **270**, 23828–37.
- Ding WG, Toyoda F, Matsuura H (2004). Regulation of cardiac IKs potassium current by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* **279**, 50726-34.

- Doheny KF, Sorger PK, Hyman AA, Tugendreich S, Spencer F, Hieter P (1993). Identification of essential components of the *S. cerevisiae* kinetochore. *Cell* **73**, 761-74.
- Donaldson MR, Jensen JL, Tristani-Firouzi M, Tawil R, Bendahhou S, Suarez WA, Cobo AM, Poza JJ, Behr E, Wagstaff J, Szepetowski P, Pereira S, Mozaffar T, Escolar DM, Fu YH, Ptacek LJ. (2003). PIP(2) binding residues of Kir2.1 are common targets of mutations causing Andersen syndrome. *Neurology* **60**, 1811-6.
- Ellgaard L and Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**,181-91.
- Ellgaard L, Molinari M, Helenius A (1999) Setting the Standards: Quality Control in the Secretory Pathway. *Science* **286**, 1882-8.
- Fairman C, Zhou X, Kung C (1999). Potassium uptake through the TOK1 K⁺ channel in the budding yeast. *J Membr Biol* **168**, 149-57.
- Fakler B, Brandle U, Glowatzki E, Weidemann S, Zenner HP, Ruppersberg JP (1995). Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K⁺ channels is caused by intracellular spermine. *Cell* **80**, 149-54.
- Fakler B, Brandle U, Glowatzki E, Zenner HP, Ruppersberg JP (1994). Kir2.1 inward rectifier K⁺ channels are regulated independently by protein kinases and ATP hydrolysis. *Neuron* **13**, 1413-20.
- Fernandez D, Ghanta A, Kauffman GW, Sanguinetti MC (2004). Physicochemical features of the HERG channel drug binding site. *J Biol Chem* **279**, 10120-7.
- Ficker E, Taglialatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM (1994). Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science* **266**, 1068-72.
- Fujiwara, Y. & Kubo, Y. (2002) Ser165 in the second transmembrane region of the Kir2.1 channel determines its susceptibility to blockade by intracellular Mg²⁺. *J. Gen. Physiol.* **120**, 677–693.
- Furuchi T and Anderson RG (1998). Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). *J Biol Chem* **273**, 21099-104.
- Gaber RF, Styles CA, Fink GR. (1988). TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**, 2848-59.
- Gaskova D, Brodska B, Herman P, Vecer J, Malinsky J, Sigler K, Benada O, Plasek J (1998). Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C₃(3) assay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1189-97.
- Gaskova D, Brodska B, Holoubek A, Sigler K (1999). Factors and processes involved in membrane potential build-up in yeast: diS-C₃(3) assay. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 575-84.
- Gaskova D, Cadek R, Chaloupka R, Plasek J, Sigler K (2001). Factors underlying membrane potential-dependent and -independent fluorescence responses of potentiometric dyes in stressed cells: diS-C₃(3) in yeast. *Biochim Biophys Acta.* **1511**, 74-9.
- Glick B (2002) Can the Golgi form de novo? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 615–9.

- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996). Life with 6000 genes. **274**, 546, 563-7.
- Gomez-Mouton C, Abad JL, Mira E, Lacalle RA, Gallardo E, Jimenez-Baranda S, Illa I, Bernad A, Manes S, Martinez-A C (2001). Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *PNAS* **98**, 9471-3.
- Gong Q, Anderson CL, January CT, Zhou Z (2002). Role of glycosylation in cell surface expression and stability of HERG potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H77-84.
- Gong Q, Jones MA and Zhou Z (2006). Mechanisms of Pharmacological Rescue of Trafficking-defective hERG Mutant Channels in Human Long QT Syndrome *J Biol Chem* **281**, 4069–74.
- Grossmann G, Opekarova M, Malinsky J, Weig-Meckl I, Tanner W. (2007). Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J* **26**, 1-8.
- Grossmann G, Opekarova M, Novakova L, Stolz J, Tanner W (2006). Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **5**, 945-53.
- Guo L, Guthrie H. (2005). Automated electrophysiology in the preclinical evaluation of drugs for potential QT prolongation. *J Pharmacol Toxicol Methods*. **52**,123-35.
- Guthrie H, Livingston FS, Gubler U, Garippa R (2005). A place for high-throughput electrophysiology in cardiac safety: screening hERG cell lines and novel compounds with the ion works HTTM system. *J Biomol Screen* **10**, 832-40.
- Haddy FJ, Vanhoutte PM, Feletou M (2006). Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R546-52.
- Hasenbrink G, Kolacna L, Ludwig J, Sychrova H, Kschischo M, Lichtenberg-Frate H (2007). Ring test assessment of the mKir2.1 growth based assay in *Saccharomyces cerevisiae* using parametric models and model-free fits. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, 1212-21.
- Hasenbrink G, Schwarzer S, Kolacna L, Ludwig J, Sychrova H, Lichtenberg-Fraté H. (2005). Analysis of the mKir2.1 channel activity in potassium influx defective *Saccharomyces cerevisiae* strains determined as changes in growth characteristics. *FEBS Lett* **579**, 1723-31.
- Haverkamp W, Breithardt G, Camm AJ, Janse MJ, Rosen MR, Antzelevitch C, Escande D, Franz M, Malik M, Moss A, Shah R (2000). The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* **47**, 219-33.
- Haverkamp W, Mönnig G, Schulze-Bahr E, Wedekind H, Haverkamp F, Eckardt L, Kirchhof P, Loh P, Breithardt G (2001). QT-Syndrome. *J Kardiol* **8**, 402-6.
- Hicke L, Dunn R (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 141-72

- Hilgemann DW and Ball R (1996). Regulation of Cardiac Na⁺,Ca²⁺ Exchange and KATP Potassium Channels by PIP₂. *Science* **273**, 956-9.
- Hoffmann CS, and Winston F (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-72.
- Hofherr A, Fakler B, Klocker N (2005). Selective Golgi export of Kir2.1 controls the stoichiometry of functional Kir2.x channel heteromers. *J Cell Sci* **118**, 1935-43.
- Hoger JH, Ilyin VI, Forsyth S and Hoger A (2002). Shear stress regulates the endothelial Kir2.1 ion channel. *PNAS* **99**, 7780–7785
- Huang CL, Feng S, Hilgemann DW (1998). Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by Gβγ. *Nature* **391**(6669), 803-6.
- Huang JP, Westman J, Quirk K, Huang JP (1988). *Water Sci Technol* **20**, 369-76.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-8.
- Ishihara K, Ehara T (2004). Two modes of polyamine block regulating the cardiac inward rectifier K⁺ current *I*_{K1} as revealed by a study of the Kir2.1 channel expressed in a human cell line. *J Physiol* **556**, 61-78.
- Jahn TP, Schulz A, Taipalensuu J, Palmgren MG (2002). Post-translational modification of plant plasma membrane H⁺-ATPase as a requirement for functional complementation of a yeast transport mutant. *J Biol Chem* **277**, 6353-8.
- Jenke M, Sánchez A, Monje F, Stühmer W, Weseloh R, and Pardo LA (2003). C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. *EMBO J* **22**, 395–403.
- Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R (2003). The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**, 42-8.
- Jones SV (1996). Modulation of the inwardly rectifying potassium channel IRK1 by the m1 muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* **49**, 662-7.
- Jongsma HJ, Wilders R (2001). Channelopathies: Kir2.1 mutations jeopardize many cell functions. *Curr Biol* **11**, 747-50.
- Kagan A, Melman YF, Krumerman A, McDonald TV (2002). 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K⁺ channel activity. *EMBO J* **21**, 1889-98.
- Kagan A, Yu Z, Fishman GI, McDonald TV (2000). The dominant negative LQT2 mutation A561V reduces wild-type HERG expression. Kagan A, Yu Z, Fishman GI, McDonald TV. *J Biol Chem* **275**, 11241-8.
- Karp G (2005) *Molekulare Zellbiologie*, 1. Auflage, Springer-Verlag, Berlin.
- Kasahara T und Kasahara M (1997). Characterization of rat Glut4 glucose transporter expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Glut1 glucose transporter. *Biochim Biophys Acta* **1324**, 111-9.
- Katzmann DJ, Epping EA, Moye-Rowley WS (1999). Mutational disruption of plasma membrane trafficking of *Saccharomyces cerevisiae* Yor1p, a homologue of mammalian multidrug resistance protein. *Mol Cell Biol* **19**, 2998-3009.

- Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK and Goldstein SA (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**, 690–5.
- Kierans M, Staines AM, Bennett H, Gadd GM (1991). Silver tolerance and accumulation in yeasts. *Biol Met* **4**, 100-6.
- Kiser GL, Gentzsch M, Kloser AK, Balzi E, Wolf DH, Goffeau A, Riordan JR (2001). Expression and degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **390**, 195-205.
- Ko CH, Buckley AM, Gaber RF (1990). TRK2 is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **125**, 305-12.
- Ko CH, Gaber RF. 1991. TRK1 and TRK2 encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4266-73.
- Kolacna L, Zimmermannova O, Hasenbrink G, Schwarzer S, Ludwig J, Lichtenberg-Fraté H and Sychrova H (2005). Phenotypic analysis of the mKir2.1 channel activity in potassium efflux deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Yeast* **22**, 1315–23.
- Koning AJ, Larson LL, Cadera EJ, Parrish ML, Wright RL (2002). Mutations that affect vacuole biogenesis inhibit proliferation of the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **160**, 1335-52.
- Ksheminska H, Jaglarz A, Fedorovych D, Babyak L, Yanovych D, Kaszycki P, Koloczek H (2003). Bioremediation of chromium by the yeast *Pichia guilliermondii*: toxicity and accumulation of Cr (III) and Cr (VI) and the influence of riboflavin on Cr tolerance. *Microbiol Res* **158**, 59-67.
- Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA (2005). International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 509-26.
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**, 127-33.
- Kupersmidt S, Yang T, Chanthaphaychith S, Wang Z, Towbin JA, and Roden DM (2002). Defective human ether-a-go-go-related gene trafficking linked to an endoplasmic reticulum retention signal in the C terminus. *J Biol Chem* **277**, 27442-8.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lawson K (2000). Potassium channel openers as potential therapeutic weapons in ion channel disease. *Kidney Int* **57**, 838-45.
- Lehmann C, Lechner H, Loer B, Knieps M, Herrmann S, Famulok M, Bauer R, Hoch M (2006). Heteromerization of innexin gap junction proteins regulates epithelial tissue organization in *Drosophila*. *Mol Biol Cell* **17**, 1676-85.
- Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* **372**, 366-9.

- Lu Y, Mahaut-Smith MP, Huang CL, Vandenberg JI (2003). Mutant MiRP1 subunits modulate HERG K⁺ channel gating: a mechanism for pro-arrhythmia in long QT syndrome type 6. *J Physiol* **551**, 253-62.
- Ma D and Jan LY (2002). ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 287-92.
- Ma D, Zerangue N, Lin YF, Collins A, Yu M, Jan YN and Jan LY (2001). Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* **291**, 316-9.
- Madrid R, Gómez MJ, Ramos J, and Rodríguez-Navarro A (1998). Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J Biol Chem* **273**, 14838-44.
- Malinska K, Malinsky J, Opekarova M, Tanner W (2003). Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol Biol Cell* **14**, 4427-36.
- Malinska K, Malinsky J, Opekarova M, Tanner W (2004). Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *J Cell Sci* **117**, 6031-41.
- Maresova L and Sychrova H (2005). Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* kha1 deletion mutants. *Mol Microbiol* **55**, 588–600.
- Maresova L, Urbankova E, Gaskova D, Sychrova H (2006). Measurements of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *FEMS Yeast Res* **6**, 1039-46.
- McDonald TV, Yu Z, Ming Z, Palma E, Meyers MB, Wang KW, Goldstein SA, Fishman GI (1997). A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I(Kr). *Nature* **388**, 289-92.
- Mercier RW, Rabinowitz NM, Ali R, Gaxiola RA, Berkowitz GA. (2004) Yeast hygromycin sensitivity as a functional assay of cyclic nucleotide gated cation channels. *Plant Physiol Biochem.* **42**, 529-36.
- Miake J, Marban E, Nuss HB, (2003) Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression. *J. Clin. Invest* **111**, 1529-36.
- Morais-Cabral JH, Zhou Y and MacKinnon R (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter *Nature* **414**, 37-42.
- Murata Y, Fujiwara Y, Kubo Y (2002). Identification of a site involved in the block by extracellular Mg²⁺ and Ba²⁺ as well as permeation of K⁺ in the Kir2.1 K⁺ channel. *J Physiol* **544**, 665-77.
- Nagaya N, Papazian DM (1997). Potassium channel alpha and beta subunits assemble in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **272**, 3022-7.
- Nakayama K, Nakanishi-Shindo Y, Tanaka A, Haga-Toda Y, Jigami Y (1997). Substrate specificity of alpha-1,6-mannosyltransferase that initiates N-linked mannose outer chain elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **412**, 547-50

- Natter K, Leitner P, Faschinger A, Wolinski H, McCraith S, Fields S and Kohlwein SD (2005). The spatial organization of lipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* derived from large scale green fluorescent protein tagging and high resolution microscopy. *Mol Cell Proteomics* **4**, 662.
- Navarre C and Goffeau A (2000). Membrane hyperpolarization and salt sensitivity induced by deletion of *PMP3*, a highly conserved small protein of yeast plasma membrane. *The EMBO Journal*, Vol. 19, No. 11 pp. 2515-2524, 2000
- Nichols BJ (2003). GM1-containing lipid rafts are depleted within clathrin-coated pits. *Curr Biol* **13**, 686-90.
- Norman AW, Demel RA, de Kruffy B, van Deenen LL (1972). Studies on the biological properties of polyene antibiotics. Evidence for the direct interaction of filipin with cholesterol. *J Biol Chem* **247**, 1918-29.
- Norris PR, Kelly DP (1977). Accumulation of cadmium and cobalt by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **99**, 317-24.
- O'Kelly I, Butler MH, Zilberberg N, Goldstein SA (2002). Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* **111**, 577-88.
- Opekarova M, Malinska K, Novakova L, Tanner W (2005). Differential effect of phosphatidylethanolamine depletion on raft proteins: further evidence for diversity of rafts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1711**, 87-95.
- Opekarova M, Tanner W (2003). Specific lipid requirements of membrane proteins--a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim Biophys Acta* **1610**, 11-22.
- Owen JM, Quinn CC, Leach R, Findlay JB, Boyett MR (1999). Effect of extracellular cations on the inward rectifying K⁺ channels Kir2.1 and Kir3.1/Kir3.4. *Exp Physiol* **84**, 471-88.
- Panama BK, Lopatin AN (2006). Differential polyamine sensitivity in inwardly rectifying Kir2 potassium channels *J Physiol* **571**, 287-302.
- Patton JL, Lester RL (1992). Phosphatidylinositol phosphate, phosphatidylinositol bisphosphate, and the phosphoinositol sphingolipids are found in the plasma membrane and stimulate the plasma membrane H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **292**, 70-6.
- Pelham HR (1995). Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 530-5.
- Perlin DS, Brown CL and Haber JE (1988). Membrane potential defect in hygromycin B-resistant *pma1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **263**, 18118-22.
- Perlmutter DH (2002) Chemical chaperones: a pharmacological strategy for disorders of protein folding and trafficking. *Pediatr Res* **52**:832-836.
- Pichler H, Gaigg B, Hrastnik C, Achleitner G, Kohlwein SD, Zellnig G, Perktold A, Daum G (2001). A subfraction of the yeast endoplasmic reticulum associates with the plasma membrane and has a high capacity to synthesize lipids. *Eur J Biochem* **268**, 2351-61.

- Pike and Casey (1996). Localization and turnover of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in Caveolin-enriched membrane domains. *J Biol Chem* **271**, 26453–6.
- Pike LJ (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* **378**, 281–92.
- Pike LJ and Miller JM (1998). Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem* **273**, 22298-304.
- Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canu´ n S, Bendahhou S, Tsunoda A, Donaldson MR, Iannaccone ST, Brunt E, Barohn R, Clark J, Deymeer F, George AL Jr., Fish FA, Hahn A, Nitu A, Ozdemir C, Serdaroglu P, Subramony SH, Wolfe G, Fu YH, Ptacek LJ. (2001) Mutations in Kir2.1 Cause the Developmental and Episodic Electrical Phenotypes of Andersen’s Syndrome. *Cell* **105**, 511–9.
- Plath K, Wilkinson BM, Stirling CJ, Rapoport TA (2004). Interactions between Sec complex and prepro-alpha-factor during posttranslational protein transport into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **15**, 1–10.
- Ploger R, Zhang J, Bassett D, Reeves R, Hieter P, Boguski M, Spencer F (2000). XREFdb: cross-referencing the genetics and genes of mammals and model organisms. *Nucleic Acids Res* **28**, 120-2.
- Prinz B, Stahl U, Lang C (2003). Intracellular transport of a heterologous membrane protein, the human transferrin receptor, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Microbiol* **6**, 49-55.
- Priori SG, Pandit SV, Rivolta I, Berenfeld O, Ronchetti E, Dhamoon A, Napolitano C, Anumonwo J, Raffaele di Barletta M, Gudapakkam S, Bosi G, Stramba-Badiale M, alife J. (2005). A Novel Form of Short QT Syndrome (SQT3) Is Caused by a Mutation in the KCNJ2 Gene. *Circ Res* **96**, 800-7.
- Raab CE, Butcher JW, Connolly TM, Karczewski J, Yu NX, Staskiewicz SJ, Liverton N, Dean DC, Melillo DG (2006) Synthesis of the first sulfur-35-labeled hERG radioligand. *Bioorg Med Chem Lett* **16**(6),1692-5.
- Raab-Graham KF, Radeke CM, Vandenberg CA (1994). Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel. *Neuroreport* **5**, 2501-5.
- Raab-Graham KF, Vandenberg CA (1998). Tetrameric subunit structure of the native brain inwardly rectifying potassium channel Kir 2.2. *J Biol Chem* **273**, 19699-707.
- Ramirez J, Ramirez O, Saldana C, Coria R, Pena A (1998). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K⁺/H⁺ exchanger. *J Bacteriol* **180**, 5860-5.
- Ramos J, Contreras P, Rodriguez-Navarro A (1985). A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **143**, 88-93.
- Ramos, J., Aligo, R., Haro, R. and Rodriguez-Navarro, A. (1994). TRK2 is not a low-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **176**, 249-252.
- Regenberg B, Villalba JM, Lanfermeijer FC, Palmgren MG (1995). C-terminal deletion analysis of plant plasma membrane H⁺-ATPase: yeast as a model system for solute transport across the plant plasma membrane. *Plant Cell* **7**, 1655-1666.

- Rezazadeh S, Hesketh JC, Fedida D (2004). Rb⁺ flux through hERG channels affects the potency of channel blocking drugs: correlation with data obtained using a high-throughput Rb⁺ efflux assay. *J Biomol Screen* **9**, 588-97.
- Rodriguez-Navarro A & Ramos J (1984) Dual System for Potassium Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **159**, 940-945
- Rodriguez-Navarro A (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* **1469**, 1-30.
- Romanenko VG, Fang Y, Byfield F, Travis AJ, Vandenberg CA, Rothblat GH, Levitan I (2004). Cholesterol sensitivity and lipid raft targeting of Kir2.1 channels. *Biophys J* **87**, 3850-61.
- Roosild TP, Le KT, Choe S (2004). Cytoplasmic gatekeepers of K⁺-channel flux: a structural perspective. *Trends Biochem Sci* **29**, 39-45
- Roy M, Dumaine R, Brown AM (1996). HERG, a primary human ventricular target of the non-sedating antihistamine terfenadine. *Circulation* **94**, 817-23.
- Ruiz A, del Carmen Ruiz M, Sanchez-Garrido MA, Arino J, Ramos J (2004). The Ppz protein phosphatases regulate Trk-independent potassium influx in yeast. *FEBS Lett* **578**, 58-62.
- Ruppersberg JP, Fakler B (1996). Complexity of the regulation of Kir2.1 K⁺ channels. *Neuropharmacology* **35**, 887-93.
- Sabirov RZ, Okada Y, Oiki S (1997). Two-sided action of protons on an inward rectifier K⁺ channel (IRK1). *Pflugers Arch* **433**, 428-34.
- Sanguinetti MC and Jurkiewicz NK (1990). Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* **96**, 195-215.
- Sanguinetti MC und Tristani-Firouzi M (2006). hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* **440**, 463-9.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Spector PS, Keating MT (1996). Spectrum of HERG K⁺-channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *PNAS* **93**, 2208-12.
- Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* **81**, 299-307.
- Sanguinetti MC, Mitcheson JS (2005). Predicting drug-hERG channel interactions that cause acquired long QT syndrome. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 119-24.
- Sato S, Ward CL, Krouse ME, Wine JJ, Kopito RR (1996). Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J Biol Chem* **271**, 635-8.
- Schachtman DP, Schroeder JI, Lucas WJ, Anderson JA, Gaber RF (1992). Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. *Science* **258**, 1654-8.
- Scherman F (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **350**, 3-41.
- Schram G, Melnyk P, Pourrier M, Wang Z, Nattel S (2002). Kir2.4 and Kir2.1 K(+) channel subunits co-assemble: a potential new contributor to inward rectifier current heterogeneity. *J Physiol* **544**, 337-49.

- Schram G, Pourrier M, Wang Z, White M, Nattel S. (2003) Barium block of Kir2 and human cardiac inward rectifier currents: evidence for subunit-heteromeric contribution to native currents. *Cardiovasc Res* **59**, 328-38.
- Schulze-Bahr E (2005). Short QT syndrome or Andersen syndrome: Yin and Yang of Kir2.1 channel dysfunction. *Circ Res* **96**, 703-4.
- Schwarzer S. (2006). Funktionelle Expression und Analyse von K⁺-Kanälen aus Säugern in *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertation der Universität Bonn.
- Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacroute F, Salmon JM, Gaymard F, Grignon C (1992). Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* **256**, 663-5.
- Serrano R (1991) in *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics* (Broach JR, Jones EW, Pringle JR, eds) , pp. 523-585, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Shieh RC, Chang JC, Arreola J (1998). Interaction of Ba²⁺ with the pores of the cloned inward rectifier K⁺ channels Kir2.1 expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys* **75**, 2313-22.
- Silve S, Volland C, Garnier C, Jund R, Chevallier MR, Haguenaer-Tsapis R (1991). Membrane insertion of uracil permease, a polytopic yeast plasma membrane protein. *Mol Cell Biol* **11**, 1114–24.
- Simmons P and Singleton I (1996) A method to increase silver biosorption by an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **45**, 278-285.
- Slack M, Kirchhoff C, Moller C, Winkler D, Netzer R (2006). Identification of novel Kv1.3 blockers using a fluorescent cell-based ion channel assay. *J Biomol Screen* **11**, 57-64.
- Smith PL, Baukowitz T, Yellen G (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* **379**, 833-6.
- Snyders DJ, Chaudhary A (1996). High affinity open channel block by dofetilide of HERG expressed in a human cell line. *Mol Pharmacol* **49**, 949-55.
- Sobey CG, Faraci FM (2000). Knockout blow for channel identity crisis : vasodilation to potassium is mediated via Kir2.1. *Circ Res* **87**, 83-4.
- Soom M, Schonherr R, Kubo Y, Kirsch C, Klinger R, Heinemann SH (2001). Multiple PIP2 binding sites in Kir2.1 inwardly rectifying potassium channels. *FEBS Lett* **490**, 49-53.
- Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC (1996). Fast inactivation causes rectification of the *I_{Kr}* channel. *J Gen Physiol* **107**, 611-9.
- Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT (1997) Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet* **17**, 338-40.
- Stanfield PR, Davies NW, Shelton PA, Sutcliffe MJ, Khan IA, Brammar WJ, Conley EC (1994). A single aspartate residue is involved in both intrinsic gating and blockage by Mg²⁺ of the inward rectifier, IRK1. *J Physiol* **478**, 1-6.

- Steck TL, Ye J, Lange Y (2002). Probing red cell membrane cholesterol movement with cyclodextrin. *Biophys J* **83**, 2118-25.
- Sturley SL (2000). Conservation of eukaryotic sterol homeostasis: new insights from studies in budding yeast. *Biochim Biophys Acta* **1529**, 155–63.
- Sychrova H (2004) Yeast as a Model Organism to Study Transport and Homeostasis of Alkali Metal Cations. *Physiol Res* **53**, 91-8.
- Tang W, Ruknudin A, Yang WP, Shaw SY, Knickerbocker A, and Kurtz S (1995). Functional expression of a vertebrate inwardly rectifying K⁺ channel in yeast. *Mol Biol Cell* **6**, 1231-40.
- Tawil, R, Ptacek, LJ, Pavlakis, SG, DeVivo, DC, Penn, AS, Ozdemir, C, Griggs, RC. (1994). Andersen's syndrome: potassium-sensitive periodic paralysis, ventricular ectopy, and dysmorphic features. *Ann Neurol* **35**, 326-30.
- Thompson GA, Leyland ML, Ashmole I, Sutcliffe MJ, Stanfield PR (2000). Residues beyond the selectivity filter of the K⁺ channel Kir2.1 regulate permeation and block by external Rb⁺ and Cs⁺. *J Physiol* **526**, 231-40.
- Tong Y, Brandt GS, Li M, Shapovalov G, Slimko E, Karschin A, Dougherty DA, Lester HA (2001). Tyrosine decaging leads to substantial membrane trafficking during modulation of an inward rectifier potassium channel. *J Gen Physiol* **117**, 103–18.
- Tristani-Firouzi M, Jensen JL, Donaldson MR, Sansone V, Meola G, Hahn A, Bendahhou S, Kwiecinski H, Fidzianska A, Plaster N, Fu YH, Ptacek LJ, Tawil R (2002). Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin Invest* **110**, 381-8.
- Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA (1995). HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* **272**, 1087.
- van der Rest ME, Kamminga AH, Nakano A, Anraku Y, Poolman B, Konings WN (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* **59**, 304-22.
- van Rheenen J, Achame EM, Janssen H, Calafat J, Jalink K (2005). PIP2 signaling in lipid domains: a critical re-evaluation. *EMBO J* **24**, 1664-73.
- Vida TA, Emr SD (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128**, 779-92.
- Vidal M, Buckley AM, Yohn C, Hoepfner DJ, Gaber RF (1995). Identification of essential nucleotides in an upstream repressing sequence of *Saccharomyces cerevisiae* by selection for increased expression of TRK2. *PNAS* **92**, 2370-4.
- Villalba JM, Palmgren MG, Berberian GE, Ferguson C, Serrano R (1992). Functional Expression of Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase in Yeast Endoplasmic Reticulum *J Biol Chem* **267**, 12341-9.
- Warmke JW, Ganetzky B (1994). A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *PNAS* **91**, 3438-42.
- Wible BA, De Biasi M, Majumder K, Taglialatela M, Brown AM (1995). Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K⁺ channel from human atrium. *Circ Res* **76**, 343-50.

- Wilson GF, Wang Z, Chouinard SW, Griffith LC, Ganetzky B (1998). Interaction of the K channel beta subunit, Hyperkinetic, with eag family members. *J Biol Chem* **273**, 6389-94.
- Wischmeyer E, Döring F and Karschin A (1998) Acute Suppression of Inwardly Rectifying Kir2.1 Channels by Direct Tyrosine Kinase Phosphorylation. *J BIOL CHEM* Vol. 273, No. 51, Issue of December 18, pp. 34063–34068,
- Wischmeyer E, Karschin A (1996). Receptor stimulation causes slow inhibition of IRK1 inwardly rectifying K⁺ channels by direct protein kinase A-mediated phosphorylation. *PNAS* **93**, 5819-23.
- Wright R, Basson M, D'Ari L and Rine J (1988). Increased amounts of HMG-CoA reductase induce "karmellae": a proliferation of stacked membrane pairs surrounding the yeast nucleus. *J Cell Biol* **107**, 101–114.
- Yan DH, Ishihara K (2005). Two Kir2.1 channel populations with different sensitivities to Mg²⁺ and polyamine block: a model for the cardiac strong inward rectifier K⁺ channel. *J Physiol* **563**, 725-44.
- Yan DH, Nishimura K, Yoshida K, Nakahira K, Ehara T, Igarashi K, Ishihara K (2005). Different intracellular polyamine concentrations underlie the difference in the inward rectifier K⁺ currents in atria and ventricles of the guinea-pig heart. *J Physiol* **563**, 713-24.
- Yang HC and Pon LA (2003). Toxicity of metal ions used in dental alloys: a study in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Drug Chem Toxicol* **26**, 75-85.
- Yang J, Jan YN, Jan LY (1995). Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron* **15**, 1441-7.
- Yenush L, Merchan S, Holmes J, Serrano R (2005). pH-Responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol Cell Biol* **25**, 8683-92.
- Zaks-Makhina E, Kim Y, Aizenman E, Levitan ES (2004). Novel neuroprotective K⁺ channel inhibitor identified by high-throughput screening in yeast. *Mol Pharmacol* **65**, 214-9.
- Zeng GF, Pypaert M, Slayman CL (2004). Epitope tagging of the yeast K⁺ carrier Trk2p demonstrates folding that is consistent with a channel-like structure. *J Biol Chem* **279**, 3003-13.
- Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, and Jan LY (1999) A New ER Trafficking Signal Regulates the Subunit Stoichiometry of Plasma Membrane KATP Channels *Neuron*, Vol. 22, 537–548, March, , Copyright ©1999 by Cell Pre
- Zhao Y, Hopkins KM, Liebermann HB (1993). A method for the preparation and storage of frozen, competent *Schizosaccharomyces pombe* spheroblasts. *BioTechniques* **15**: 23.
- Zitron E, Scholz EP, Kiesecker C, Pirot M, Kathöfer S, Thomas D, Kiehn J, Katus HA, Becker R, Karle CA (2006). Molekulare Grundlagen primär elektrischer Herzerkrankungen. *Herzschr Elektrophys* **16**, 229–38.
- Zünkler BJ, Kuhne S, Rustenbeck I, Ott T. (2000). Mechanism of terfenadine block of ATP-sensitive K⁺ channels. *Br J Pharmacol* **130**, 1571-4.

Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, van 't Riet K (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* **56**, 875–1881

7 Anhang

7.1 Konstruktion der Plasmide

7.1.1 Konstruktion von pYEx-GFP-HERG

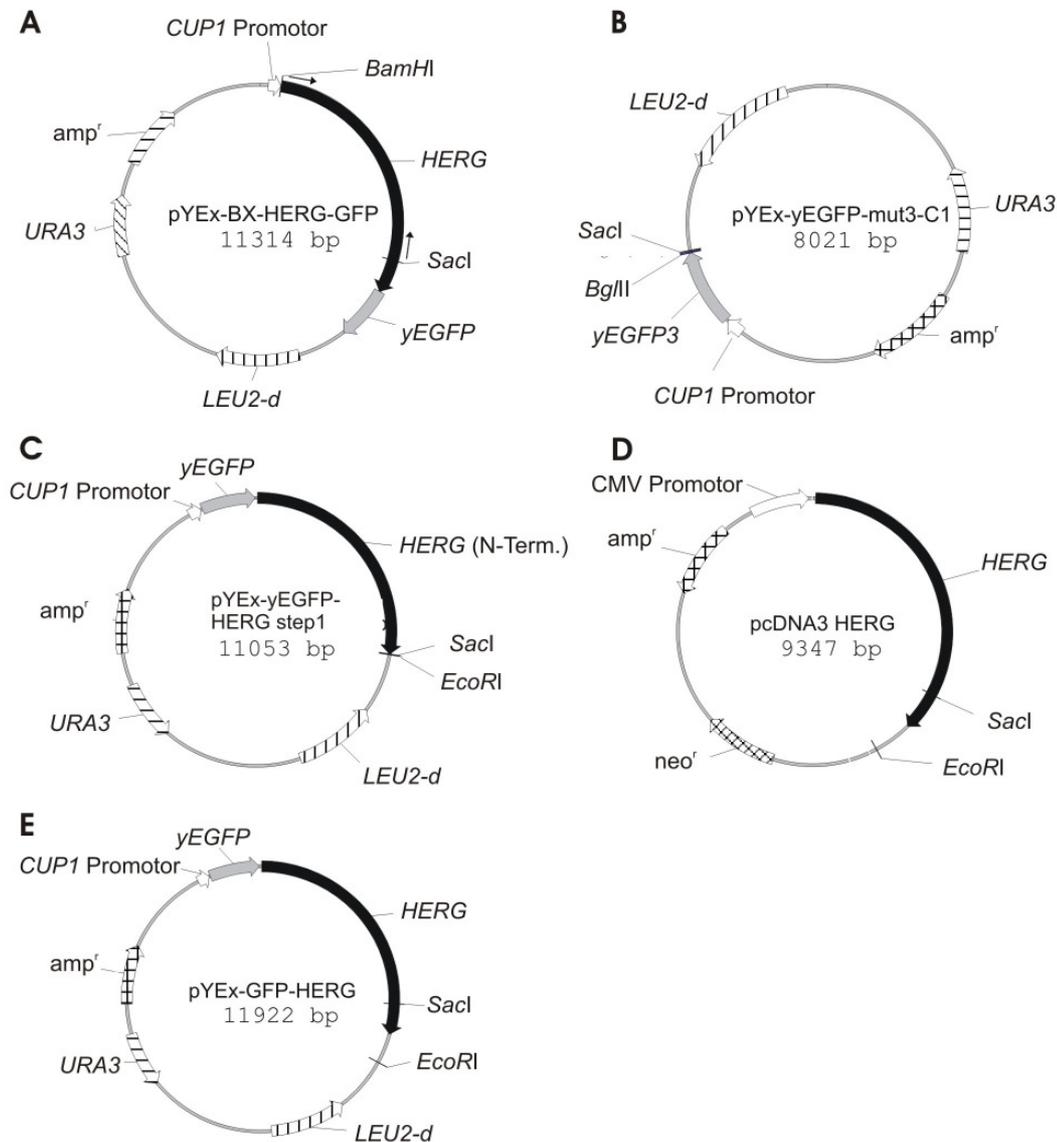


Abb. 7.1 Konstruktion von pYEx-GFP-HERG: Das Plasmid pYEx-BX-HERG-GFP (**A**) wurde mit *Bam*HI und *Sac*I geschnitten und das resultierende 3043 bp lange Fragment (siehe Pfeile) wurde mit dem 8010 bp langen Fragment des *Bgl*II/*Sac*I geschnittenen Plasmids pYEx-yEGFP-mut3-C1 (**B**) ligiert. Dadurch wurde der N-terminale Teil von *HERG* stromabwärts von *yEGFP* unter die Kontrolle des *CUP1* Promotors gestellt. Die korrekte Konstruktion des resultierenden Plasmids (pYEx-yEGFP-HERG-step1, **C**) wurde durch eine *Xho*I/*Bam*HI-Restriktionsspaltung und Auftrennung im Agarosegel bestätigt (ohne Abbildung). pYEx-yEGFP-HERG-step1 wurde daraufhin mit *Sac*I/*Eco*RI geschnitten. Das resultierende 11044 bp lange Fragment wurde mit dem 878 bp langen Fragment des mit *Sac*I und *Eco*RI gespaltenem Plasmids pcDNA3 HERG (**D**) ligiert. Die korrekte Konstruktion des resultierenden Plasmids (pYEx-GFP-HERG, **E**) wurde durch eine *Sac*I/*Bam*HI-Restriktionsspaltung und Auftrennung im Agarosegel bestätigt (ohne Abbildung).

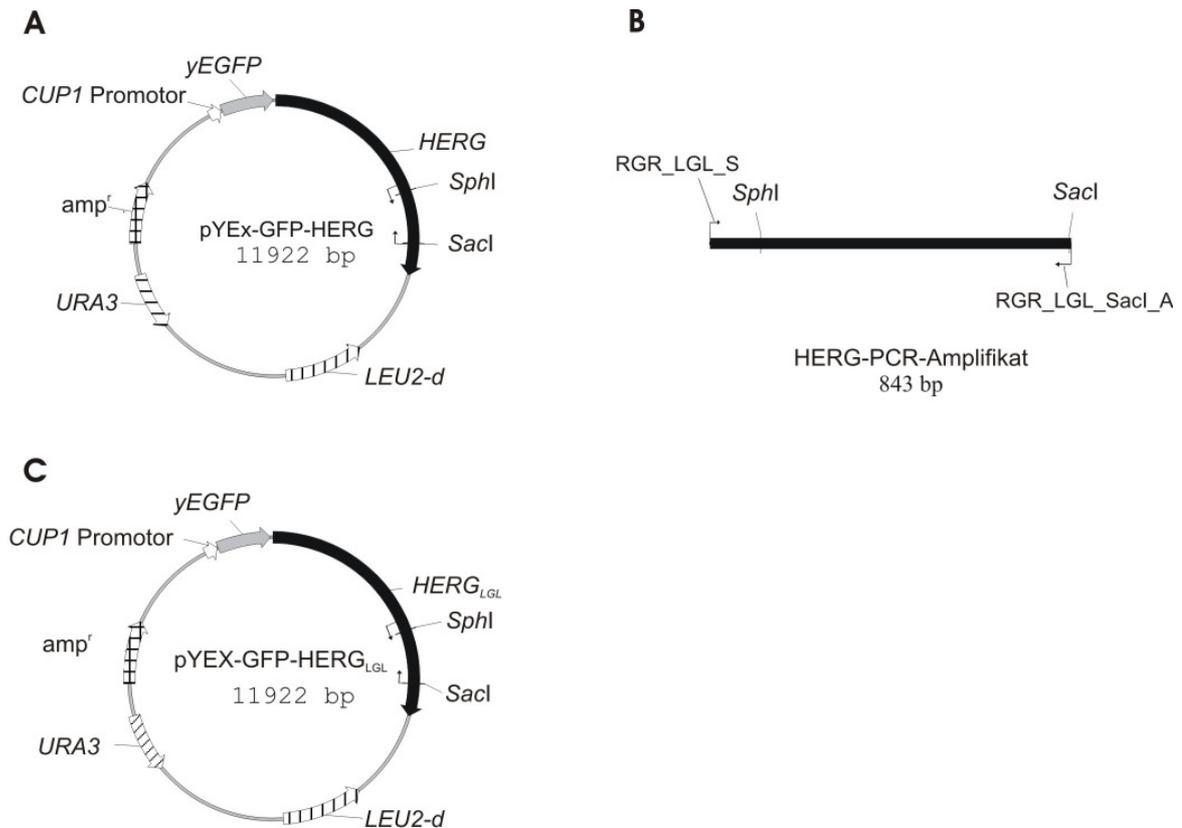
7.1.2 Konstruktion von pYEx-GFP-HERG_{LGL}

Abb. 7.2 Konstruktion von pYEx-GFP-HERG_{LGL}: Die *HERG*-cDNA auf dem Plasmid pYEx-GFP-HERG_{LGL} (**A**) diene als Matrize für eine PCR (2.7.13) mit den Primern RGR-LGL_S und RGR-LGL_SacI_A (Tab. 2.6). Die amplifizierte Sequenz ist in **A** durch die beiden Pfeile gekennzeichnet, das PCR-Amplifikat ist in **B** dargestellt. Der stromaufwärts-Primer bindet stromaufwärts der *SphI*-Restriktionsschnittstelle und der stromabwärts-Primer RGR-LGL_SacI_A enthielt neben der in **A** angegebenen Restriktionsschnittstelle *SacI* fünf Nukleotidaustausche gegenüber der Matrize zur Mutation des ER-Retentionssignals RGR (nach Kupersmidt *et al.*, 2002). Das PCR-Amplifikat wurde mit *SphI* und *SacI* geschnitten und das resultierende 721 bp lange Fragment wurde mit dem 11201 bp langen Fragment des ebenfalls mit *SphI/SacI* geschnittenen Plasmids pYEx-GFP-HERG ligiert. Hieraus resultierte das Plasmid pYEx-GFP-HERG_{LGL} (**C**). Die Modifikation der *HERG*-Sequenz wurde durch eine Sequenzierung (2.7.12) mit den Primern *herg_s5* und RGR-LGL_S (Tab. 2.6) bestätigt.

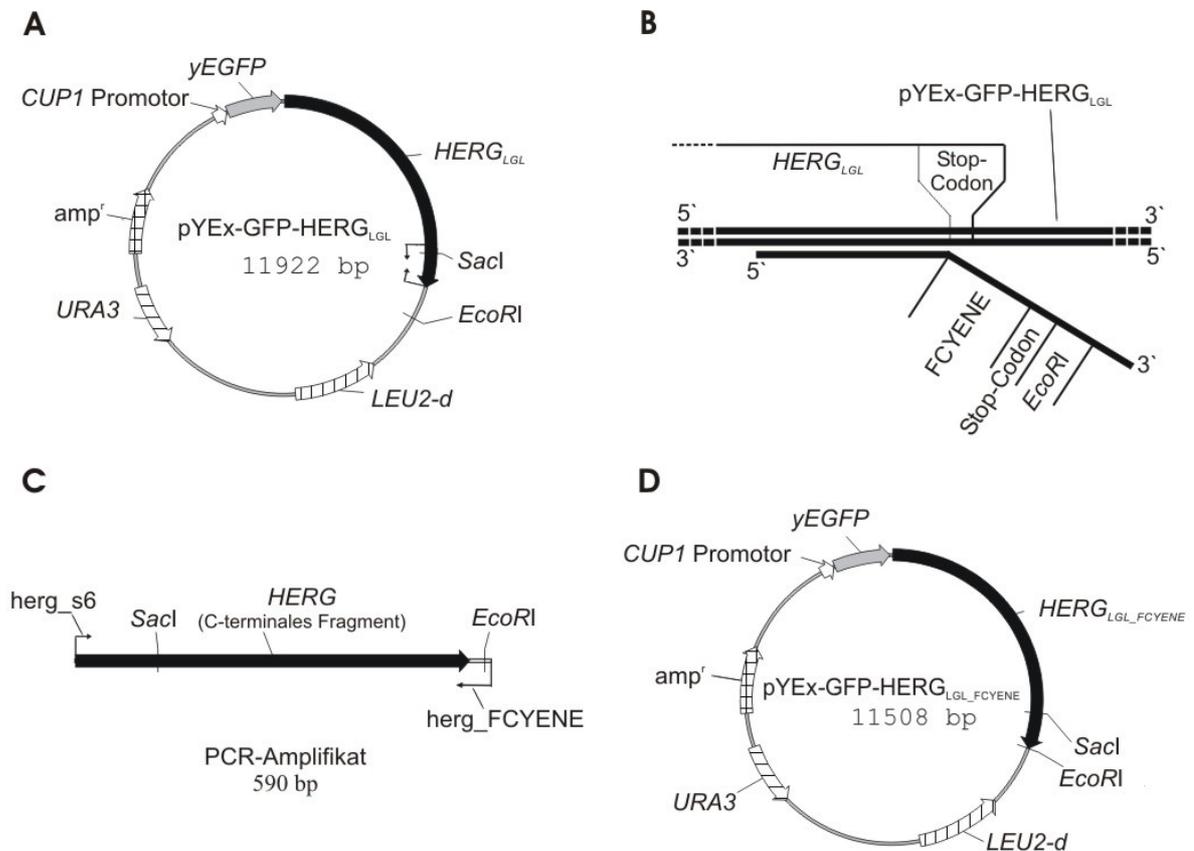
7.1.3 Konstruktion von pYEx-GFP-HERG_{LGL_FCYENE}

Abb. 7.3 Konstruktion von pYEx-GFP-HERG_{LGL_FCYENE}: Der C-terminale Teil von *HERG* (ohne Stop-Codon) auf dem Plasmid pYEx-GFP-HERG_{LGL} (**A**) diente als Matrize für eine PCR mit den Primern *herg_s6* und *hERG_FCYENE* (Tab. 2.6). Durch den nicht komplementären Teil des „Gegensinn“-Primers *herg_FCYENE* (schematische Darstellung in **B**) wurden stromabwärts der *HERG*-Sequenz im PCR-Amplifikat (**C**) die Sequenz für das ER-Exportsignal aus den Aminosäuren FCYENE (nach Ma *et al.*, 2001), ein Stop-Codon und eine *EcoRI*-Schnittstelle generiert. Das PCR-Amplifikat wurde mit *Sacl/EcoRI* geschnitten und das resultierende 464 bp lange Fragment wurde mit dem 11044 bp langen Fragment des ebenfalls mit *Sacl/EcoRI* geschnittenen Plasmids pYEx-GFP-HERG_{LGL} zu dem Plasmid pYEx-GFP-HERG_{LGL_FCYENE} (**D**) ligiert. Die Modifikation der *HERG*-Sequenz wurde durch Sequenzierung (2.7.12) mit den Primern *herg_s6* und *herg_s7* (Tab. 2.6) bestätigt.

7.2 Standardarbeitsanweisung (SOP) für Substanztests

Name of the test:

Yeast growth based assay for expressed mammalian K⁺ channel genes

Version Number: 1

Date: July 2005

Approved:

1 Background

Selective membrane permeability to small ions represents the basis of fundamental cell activities such as the generation and propagation of electrical impulses in nerve and muscle cells, the release of neurotransmitters and hormones and epithelial transport. Selectivity is achieved by proteins that form specific channels for the movement of ions through the cell membrane and reflected in the common names of the channels, i.e. Ca²⁺ -, Cl⁻ -, Na⁺ - or K⁺ channels. Under structural as well as functional aspects, Potassium (K⁺) channels represent by far the most diverse group of ion channels known. In excitable and non-excitable cells they are responsible for maintaining the resting potential. In excitable tissue outward currents mediated by K⁺-channels underly the repolarisation of the action potential, originally described by Hodgkin & Huxley (1952) as "delayed rectifier" and thereby regulate the shape and frequency of action potentials.

In view of the widespread distribution and functional diversity of potassium channels, it is not surprising that mutations affecting the function of these channels can cause a variety of seemingly unrelated disorders affecting a variety of organs and tissues. The term channelopathy has been introduced to indicate that these syndromes and diseases share a common molecular defect and may therefore be viewed as similar physiopathological entities. A number of heritable human diseases, e.g. ventricular tachycardia, hypertension, deafness and certain metabolic disorders are associated with ion channel dysfunction. The pathophysiology of a number of K⁺ channel mutations have been identified to cause inherited paroxysmal and chronic disorders, e.g. more than 100 mutations within the human inward rectifying K⁺ channels HERG, and KCNQ1/minK have been reported, some of them shown to cause forms of ventricular arrhythmia (torsades des pointes) with Q-T prolongation, convulsive seizures and paroxysmal ventricular fibrillation known as LQT1-5 syndrome. Non-functional mutations in the related K⁺ channel KCNQ4 are involved in an dominant form of progressive hearing loss. All these diseases have a severe socio-economic impact.

Thus ion channels are very attractive targets for potential pharmacological treatment. To date few drugs that specifically elicit their effect by blocking or activating individual subtypes of ion channels have been identified but have limited clinical use due to their severe adverse effects. Examples include the local anaesthetic lidocaine (Na⁺ channel blocker), the anti-diabetic glibenclamide (K⁺ channel blocker), the anti-hypertensive and anti-arrhythmic nifedipine (Ca²⁺ channel blocker). The search for new, potent and selective drugs, which interact with specific ion channels, is strongly technology-driven and focused on high throughput.

K⁺ channels as important targets for potential pharmacological treatment have been extremely difficult to study in comparison to other drug targets such as receptors. Of particular interest to the regulatory authorities and the pharmaceutical industry is the fact that several new drugs have been recently withdrawn due to severe adverse effects on K⁺ channels. With increased knowledge regarding the function of these channels and when more specific modulators of their activity are available, it is likely that the use of such compounds may be of great value to improve patients' responses to drug therapies. Additionally, there is a growing interest among pharmaceutical companies in developing targeted drugs to specific K⁺ channel molecules.

Scientific and technological basis

Saccharomyces cerevisiae cells express three K⁺ specific transport systems. Two related proteins, Trk1p and Trk2p, derive energy from the plasma membrane potential to transport K⁺ into the yeast cell. The third major K⁺ transport system, encoded by the *TOK1* gene, is a delayed outwardly rectifying K⁺-channel. Yeast cells carrying deletions in all three transport systems lose the capacity to grow on media containing millimolar concentrations of K⁺, but are viable and grow at rates indistinguishable from wild-type cells when propagated on media supplemented with high K⁺ concentrations (> 0.1 M).

2 Scope of the test

The cloning and characterisation of the three yeast K⁺ transport systems has enabled the generation of yeast strains lacking detectable K⁺ transport activity. This unique availability of K⁺ transport defective yeast strains has made possible this new approach for the analysis of mammalian K⁺ channels by functional complementation in yeast. Heterologous expression of mammalian ion channel proteins in yeast provides the means to probe functional complementation and thus pharmacological properties by growth based assays.

Haploid yeast strains used throughout this study are *S. cerevisiae* 240 (*MATa, ura 3-52, trp 1Δ63, leu 2, 232, his3Δ200, trk1, trk1::kanMX*), 246 (*MATa, ura 3-52, trp 1Δ63, leu 2Δ1, his3Δ200, trk1, trk2::kanMX, tok1Δ1::HIS3*), the *S. cerevisiae* wildtype and respective strains transformed with K channel genes.

All yeast cells are grown at 30 °C. Nutritional requirements appropriate for selection and maintenance of mutants and plasmids in the transformed strains are scored on minimal YNB media consisting of 0.67% Difco yeast nitrogen base and 2% carbon source (D-glucose), supplemented with the appropriate amino acids (Fluka, Switzerland) without uracil and leucine (Sigma, USA), the latter to utilize the LEU2-d function of the vector to increase for plasmid copy numbers. Glucose (40% w/v) and 100x amino acid stock solutions are filter sterilised and added after autoclaving (see also detailed procedures). The pH of the prepared media without additional adjustments is 5.9.

For quantitative assessment of the growth and the fluorescence development, cells from a single colony are grown overnight (16h at 30 °C) in YNB medium and diluted

in the respective media to an optical density (OD) of 0.2 (Pharmacia Ultrospec 2000 Spectrophotometer) corresponding to $3 \cdot 10^6$ cells/ml (as start OD in the test and control cultures). For each tested K channel gene and condition at least 4 replicate tests are carried out on different days. Test compounds are added at different concentrations and inoculated cultures are incubated at 30 °C with 950 rpm rotary shaking. Each experiment consists of one control and up to seven test concentrations with growth inhibition scored between >0 % and <100 %. The growth is estimated by measuring the light absorption at 600 nm continuously with 60 min interval read-outs for 16 h in transparent 96-well microtiter plates (Falcon) in a TECAN Spectrofluor Plus. Tests are considered as valid when the turbidity of the control cultures increase at least five times during the incubation period. Effects were calculated by quantifying the extent of growth inhibition in the test cultures in comparison to control cultures. Corresponding EC₅₀ values were determined by interpolated regression analysis.

3 Limitations of the assay

4 Procedures: Detailed procedures are provided on separate sheets according to the following steps:

- 1) Yeast cryopreservation
- 2) Media for cultivation
- 3) Preparation of pre-cultures
- 4) Assay design
- 5) Data analysis

4.1 Cryopreservation of the yeast strains: Glycerol stock

The following steps have to be done under sterile conditions

- Use a logarithmic grown yeast culture, cultivated in SDAP liquid medium with 0.5 % glucose, pH 5.9 and 100 mM KCl (section 4.2.1). Visual inspection (magnification of 600x) of the cells must result in a majority (> 70 %) of budding cells.
- The first preparation of glycerol stocks of the respective strain are carried out as duplicate - one of these must always be kept in reserve at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Pellet 1.5 ml of the yeast culture in a 1.5 ml micro tube with snap-cap at $825 \times g$ for 3 minutes in a bench-top centrifuge.
- Remove 1 ml of the supernatant and resuspend the pellet in the remaining supernatant ($\sim 500\ \mu\text{l}$).
- Add $500\ \mu\text{l}$ glycerol solution with appropriate glycerol concentration (use glycerol of analytical grade solved in Aqua bidest) for a final glycerol concentration of 50 % or alternatively 30 % and mix the tube content (pipetting or vortexing).
- Store the yeast culture at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 years maximum.
- To thaw the glycerol stock keep the tubes on ice for 10 minutes (during use of glycerol stocks keep them on ice until refreezing).

Spread out $50\ \mu\text{l}$ of the glycerol stock on solid media (agar plates with permissive conditions for long-term usage = 1 month maximum, see section 4.2.2).

4.2 Media for cultivation

Note: All chemicals used have to be of analytical grade – otherwise it is noted

4.2.1 Liquid Medium:

Preparation of SDAP-medium with 0,5% glucose, pH 5.9, 10 mM KCl and 100 mM KCl respectively

Components for 1000 ml liquid medium

- 1.74 g L-arginine
- 1 ml 0.2 M CaCl₂-solution (in aqua bidest^{*})
- 1 ml 2 M MgSO₄-solution (in aqua bidest^{*})
- 10 ml trace element 100x stock solution (section 4.2.3.1)
- adjust the pH to 5.9 by highly concentrated (e.g. 85 %) ortho phosphoric acid (H₃PO₄)
- add aqua bidest^{*} to 934 ml and autoclave (20 min at 121 °C).

the following steps have to be done under a clean-bench:

- after autoclaving (and cooling down to approx. 50 °C) add the following filter sterilised (pore size 0.2 µm) stock solutions
- 10 ml vitamin 100x stock solution (section 4.2.3.2)
- 10 ml **selective marker** 100x stock solution (section 4.2.4)
- 12.5 ml 40 % glucose (in aqua bidest^{*})
- add the required amount of KCl by adjusting with sterile 3 M KCl stock solution (solved in aqua bidest^{*}) up to the final concentration 10 mM KCl and 100 mM KCl respectively.
- adjust up to 1000 ml with sterile aqua bidest^{*}.
- Prepare 100 to 200 ml working aliquots of both media with 10 mM KCl and 100 mM KCl respectively

^{*} *alternatively use Milli-Q pure water*

4.2.2 Solid Medium:

Preparation of SDAP agar plates with 2 % glucose, pH 5.9

Components for 1000 ml medium

- 1.74 g L-arginine
- 1 ml 0.2 M CaCl₂-solution (in aqua bidest^{*})
- 1 ml 2 M MgSO₄-solution (in aqua bidest^{*})
- 10 ml trace element 100x stock solution (section 4.2.3.1)
- add aqua bidest^{*} to 840 ml
- adjust the pH to 5.9 by highly concentrated (e.g. 85%) ortho phosphoric acid (H₃PO₄)
- 20 g purified agar (Sigma #A7921) (not purified agar may contain substantial amounts of potassium salts)
- add aqua bidest^{*} to 897 ml and autoclave (20 min at 121 °C).

the following steps have to be done under a clean-bench:

immediately after autoclaving add the following sterile filtered stock solutions to the still hot (60-80 °C) medium.

- 50 ml 40 % glucose (in aqua bidest^{*})
- 10 ml **selective marker** 100x stock solution (section 4.2.4)
- 10 ml vitamin 100x stock solution (section 4.2.3.2)
- add the required amount of KCl by adjusting with sterile 3 M KCl stock solution (in aqua bidest^{*}) up to the final concentration.
- pour this solution (the temperature must still be above 40 °C) into sterile petri dishes (about 20 ml per petri dish, 9 cm diameter) and let the agar solidify. Afterwards put the cover lid on.
- the agar plates can be stored in plastic bags at 4 °C for up to 6 weeks.

^{*} *alternatively use Milli-Q pure water*

4.2.3 stock solutions

4.2.3.1 Trace elements 100x stock solution (in aqua bidest *)

FeNaEDTA	1.3 mM
H ₃ BO ₃	0.8 mM
CuSO ₄	25 µM
KI	60 µM
MnSO ₄	270 µM
Na ₂ MoO ₄	100 µM
ZnSO ₄	250 µM
CoCl ₂	50 µM
NiCl ₂	50 µM

Following filter sterilisation (0.2 µm) store stock solution at 4 °C (up to 6 months).

4.2.3.2 Vitamins 100x stock solution (in aqua bidest *)

Biotin	200 µg/l
Calcium pantothenate	40 mg/l
Folic acid	200 µg/l
Inositol	200 mg/l
Niacin	40 mg/l
p-Aminobenzoic acid	20 mg/l
Pyridoxine hydrochloride	40 mg/l
Thiamine hydrochloride	40 mg/l

Following filter sterilisation (0.2 µm) store stock solution at 4 °C (up to 6 months).

Folic acid containing stock solutions are light sensitive and must be kept in the dark.

* *alternatively use Milli-Q pure water*

4.2.4 Selective markers

Selective marker 100x stock solution (solved in aqua bidest^{*})

Prepare a ready to use mixed stock solution of

uracil (2 mg/ml),

L-tryptophan (2 mg/ml),

L-histidine-HCl x H₂O (2 mg/ml)

Following filter sterilisation (pore size 0.2 µm) store stock solutions at RT (up to 6 months). L-tryptophan is light sensitive! Cover the vessel with aluminium foil.

** alternatively use Milli-Q pure water*

4.3 Yeast starter and pre-culture cultivation

50 µl of a glycerol stock of a yeast strain expressing a heterologous K⁺ channel (see section 4.1) are spread out on SDAP agar plates (section 4.2.2) for long term usage (1 month maximum) supplemented with 100 mM KCl. These permissive conditions ensure that spontaneous mutations in other genes (e. g. glucose or amino acid transporters) that result in the alteration of K-translocation activity (which occur quite often under non-permissive conditions) are avoided.

- Select four single colonies for inoculating pre-cultures.
- Confirm the localisation/expression pattern of GFP fluorescence in the cells by fluorescence microscopy (for GFP/mKir2.1 fusion constructs punctiform, spotlike fluorescence along the plasma membrane is expected, in contrast to an even distribution in the cytoplasm in the control strain). For this purpose inoculate from each selected single colony (take only a part of the cell material) in 1 ml SDAP-medium (section 4.2.1) with 100 mM KCl in sterile glass test-tubes with metal tight-lock cap. Incubate the tubes overnight on a rotary shaker at 30 °C and 220 rpm (25 mm amplitude).
- For preparing pre-cultures take some cell material of one of the selected single colonies to inoculate 10 ml SDAP-medium (section 4.2.1) with 100 mM KCl in sterile 50 ml Erlenmeyer flasks with cellulose stopper or metal tight-lock cap.
- incubate the flasks on a rotary shaker at 30 °C and 220 rpm (12.5 mm amplitude) until the cells enter the stationary phase (~ 72 h). The cell density should be above 4.5 x 10⁷ cell/ml and the visual inspection (microscope, 600x) of the cells should result in a low percentage of budding cells.
- Such a yeast culture should be stored at 4 °C and can be used as pre-culture for subsequent tests for 5 days maximum.
- For further experiments inoculate fresh medium in a glass test tube.

4.4 Conduction of the assay

4.4.1 Preparation of the compound working solutions

The compounds are dissolved as 10 mM concentration in solvent e.g. dimethyl sulfoxide (DMSO).

- Compound stock solutions are stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Prepare compound stocks of 100 μl , 50 μl , 30 μl and 10 μl aliquots. Some compounds are sensitive to repeated thaw/freeze cycles. Working aliquots are kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until usage.
- Dilution of the compounds with an appropriate solvent (e.g. DMSO) to the required final concentration must not exceed 3 % of the total test volume. For instance to a 100 μl test volume ideally 3 μl compound working solution is added. Working aliquots of the compounds are prepared to give final concentrations in a total of 3 μl volume.
- During the preparation/pipetting of the actual test plate protect the compounds from light because some compounds are particularly light-sensitive.
- For compounds without known parameters of inhibition kinetics of the heterologous K^+ channel (e.g. EC_{50} -value) chose final test concentrations of 1, 5, 25, 100 and 500 μM .

4.4.2 Assay-design

4.4.2.1 General remarks

Currently (*status quo* February 2005) the effect of different compound concentrations on the growth of the yeast cells is determined by optical density (OD_{600} , OD_{595} or OD_{450}) read outs. The measurements are performed in microplate readers, e.g. Spectra Fluor plus (TECAN) or equivalent readers and microtiter plates with flat clear bottom (e.g. Falcon or Greiner for the TECAN reader).

- Each experiment is performed by using the mKir2.1 expressing strain PLY240*tok1*::GFP/mKir2.1 (#193) and the corresponding control strain PLY240*tok1*::GFP (#168) under permissive and non-permissive conditions to detect channel specific and/or cytotoxic effects.
- Each experiment consists of one control and up to 5 compound test concentrations to score inhibition between $> 0\%$ and $< 100\%$
- The cell growth is determined by measuring the light absorption at 600 nm, 595 nm or 450 nm at ≤ 15 min intervals for in total 15 h in transparent 96-well microtiter plates (see above) in the microplate reader.

- Tests are considered as valid when the mean turbidity of the negative culture controls (section 4.4.2.2) after subtraction of the corresponding medium value under non-permissive conditions without compound increase at least two and a half times after the incubation period.

4.4.2.2 Assay

- Per plate (96 wells): For both the mKir2.1 expressing strain (#193) and the corresponding control strain (#168) cells are pelleted from 2 x 0.8 ml pre-culture (3000 x *g*, 3 min). Remove supernatant, resuspend the cells each in 1 ml sterile aqua bidest and pellet the cells again (3000 x *g*, 3 min). In the following steps cell density is determined indirectly by means of optical density measurement. Remove supernatant and resuspend cells in 1 ml

a) permissive and

b) non-permissive SDAP medium (section 4.2.1)

- Control cell density and adjust with the appropriate SDAP medium to a final cell density of 0.4×10^7 cells/ml.
- Control cell density once again to assure the respective value for cell density. If necessary adjust with appropriate SDAP medium or respective cell suspension.
- 100 μ l aliquots of this cell suspension (cell density of 0.4×10^7 cells/ml) in a) permissive and b) non-permissive conditions (please refer to plate organisation section 4.4.3) are pipetted in each well. According to plate organisation add 3 μ l compound solution of the required concentration to the respective wells. Final volume: 103 μ l.
- Perform the assay with the following control suspensions:
 - **Negative blank controls:** 100 μ l SDAP-medium without cells in a) permissive and b) non-permissive medium conditions and 3 μ l solvent; (required number derive from section 4.4.3 plate organisation)
 - **Negative culture controls:** 100 μ l cell suspension (cell density of 0.4×10^7 cells/ml) in a) permissive and b) non-permissive medium conditions and 3 μ l solvent; (required number derive from section 4.4.3 plate organisation)
 - **Positive culture controls:** 100 μ l cell suspension (cell density of 0.4×10^7 cells/ml) in non-permissive conditions and 3 μ l CsCl-solution solved in A. bidest (or alternatively Milli-Q water) for final test concentrations of 0, 21 and 32 μ M CsCl (required number derive from section 4.4.3 plate organisation).

- Seal lid of the plate with parafilm. If strong condensation on the microplate lid occurs during the test, cover and seal microplate without lid with breathable sealing membrane.
- Take plate into reader, adjust the wavelength and start experiment by reading optical density at time zero (t0).
- By usage of a programmable instrument: Set the program for a long term measurement with OD measurements in ≤ 15 minutes intervals for 15 hours with 3 minutes shaking before the first readout and continuous shaking between successive read-outs. Incubation temperature has to be 30 °C.

4.4.3 Plate organisation

Recommended example of pipetting schemes:

example for a plate, where n=3 for mKir2.1 expressing strain and corresponding control strain at 5 different compound concentrations and a positive control

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	c0blk	c1blk	c2blk	pc0	pc70	pc150	pc0	pc70	pc150	c3blk	c4blk	c5blk	10 mM KCl
B	c5	c4	c3	c2	c1	c0	c0	c1	c2	c3	c4	c5	
C	c5	c4	c3	c2	c1	c0	c0	c1	c2	c3	c4	c5	
D	c5	c4	c3	c2	c1	c0	c0	c1	c2	c3	c4	c5	
E	c5	c4	c3	c2	c1	c0	c0	c1	c2	c3	c4	c5	100 mM KCl
F	c5	c4	c3	c2	c1	c0	c0	c1	c2	c3	c4	c5	
G	c5	c4	c3	c2	c1	c0	c0	c1	c2	c3	c4	c5	
H	c0blk	c1blk	c2blk	pc0	pc70	pc150	pc0	pc70	pc150	c3blk	c4blk	c5blk	
	control						mKir2.1						

green: media w/o cells (blanks, "...blk")

c: indicates compound, followed by concentration #

pc: indicates a positive control that is application of rising effective concentrations of CsCl solved in A. bidest (or alternatively Milli-Q water) that are used as standards. It is followed by the final test concentration of CsCl in μM (e.g.: "pc70" = positive control with a final test concentration of 70 μM CsCl).

The upper part (lines A-D) of the microtitre plate as well as the wells H4-H9 is used for non-permissive conditions, the lower part (rows E-H, except H4-H9) for permissive conditions.

Besides the negative blank control wells (A1-A3, A10-A12, H1-H3 and H10-H12) the left part (columns 1-6) is used for the control strain #168 and the right part (columns 7-12) is used for the mKir2.1 expressing strain #193.

- use only one solvent per microplate (except for the positive culture control)

4.5 Data evaluation

The yeast cell growth at different compound concentrations is determined by calculating the integral under the OD curves.

- For each compound concentration and condition mean values are calculated and corrected for mean media controls of corresponding potassium concentration. The resulting values are plotted versus time. The corresponding graph shows simple growth curves (OD versus time). Each single curve represents a compound concentration under permissive or non-permissive conditions.
- An approximation of the integral under the growth curve should be calculated for the interval 0-12,5h. Subtraction of the start-OD from each single OD value facilitates a definition of zero growth that is no increase or decrease of the optical density on average in the respective time interval. For determining the start-OD calculate the average OD value between 0h and 2h inclusive. Subtract this value from each single OD value. For calculating the approximated integral under the OD curve sum up all single OD values after subtraction of the start-OD in the interval from 0h to 12,5h and multiply the result with the time interval between single readouts. Although no real integral in the mathematical sense is calculated here this calculation supplies an equivalent value that needs no defined unit.
- Calculate relative growth i.e. the ratio of integral OD to the integral OD observed w/o compound (c0, solvent control)
- Plot the relative growth versus compound concentrations. This will ideally result in a dose-response curve.

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht worden ist.

Bonn, 18. März 2007

Guido Hasenbrink-Martini