

## 1 Einleitung

### 1.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle kommen in allen Zellen vor, werden von einem oder mehreren Proteinen gebildet, und bilden Poren in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran aus. Sie werden nach dem Ionentyp benannt, den sie spezifisch durchlassen. Für andere Ionen ist ihre Durchlässigkeit bis zu 10000 fach geringer. Ionenkanäle können durch Konformationsänderungen oder einen externen Porenverschluss zwischen geschlossenen und offenen Zuständen wechseln. Sie nutzen den durch die Ionenpumpen erzeugten elektrochemischen Gradienten, um Ionen entlang dieses Gradienten in die Zelle hinein oder aus ihr heraus fließen zu lassen.

Der Transport von Ionen durch die Zellmembran kann verschiedene Gründe haben. Sie dienen der Versorgung der Zelle mit ausgewählten Ionen, z. B.  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  im Sinne der Ionenhomöostase, der Errichtung oder Veränderung von Membranpotentialen und dem Aufbau von Ionengradienten für gekoppelte Transportvorgänge.

### 1.2 Kaliumkanäle

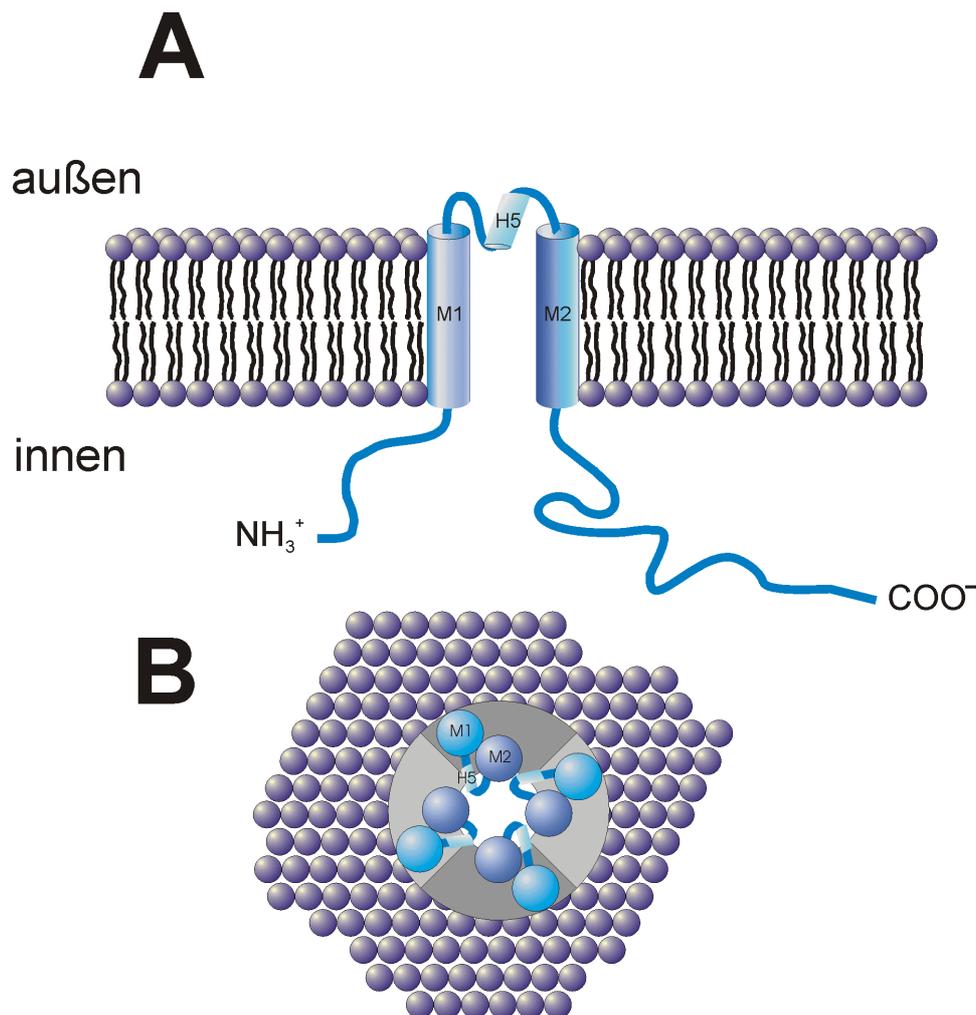
Kaliumkanäle sind die häufigsten und vielfältigsten aller bekannten Ionenkanäle. Sie kommen sowohl in eukaryontischen als auch prokaryontischen Zellen vor und stammen phylogentisch von einer gemeinsamen Urform ab (Derst und Karschin, 98). Beim Menschen sind über 50 verschiedene Kaliumkanal-Gene bekannt. Sie kommen in allen Geweben und Organen vor, und sind an einer Vielzahl von Funktionen, wie Osmoregulation,  $K^+$ -Homöostase, sekretorischen Prozessen, Signaltransduktion und der Regulation des Membranpotentials sowohl erregbarer als auch nicht-erregbarer Zellen beteiligt (Coetzee et al, 99). In Nervenzellen regulieren sie das Niveau des Ruhepotentials und bestimmen die Frequenz und den Verlauf von Aktionspotentialen.

Für diese verschiedenen Funktionen existieren unterschiedliche Kaliumkanäle. Ihre Vielfalt wird durch mehrere Faktoren ermöglicht. Es existiert eine große Anzahl von Genen, und von einem Gen können durch alternatives Splicing mehrere mRNA Transkripte erzeugt werden.

Der funktionsfähige Kaliumkanal wird durch die Zusammenlagerung mehrerer Untereinheiten gebildet. Es können sich gleiche (homooligomere), oder unterschiedliche (heterooligomere) Untereinheiten zusammenlagern. Bis zu vier Untereinheiten bilden den Kanal und werden als primäre oder  $\alpha$ -Untereinheiten bezeichnet. Die innere Wand der Kanalpore wird dabei stets von vier Transmembrandomänen ausgekleidet, die als  $\alpha$ -Helices die Plasmamembran durchziehen (Doyle et al, 98). Weitere Proteine können mit den  $\alpha$ -Untereinheiten assoziiert sein und werden dann akzessorische oder  $\beta$ -Untereinheiten genannt. Die Kaliumkanäle werden in drei größere Gruppen unterteilt, welche sich in der Zahl der Transmembrandomänen (2, 4 oder 6) der  $\alpha$ -Untereinheit unterscheiden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der elementarsten Gruppe, deren Aufbau die Mindestanforderungen an einen Kaliumkanal erfüllt. Jede  $\alpha$ -Untereinheit besitzt nur 2 Transmembrandomänen. Diese werden als M1 bzw. M2 bezeichnet (Jan und Jan, 94) und bilden die Wand der Pore. M1 und M2 kommen auch bei allen anderen Kaliumkanälen vor. Zwischen den Transmembrandomänen befindet sich die H5, auch P genannte,  $\alpha$ -Helix, deren Aminosäuresequenz um ein T-X(4)-G-[Y/F/L]-G Motiv (Doyle et al, 98) allen Kaliumkanälen gemeinsam ist. Dieser Abschnitt ist für die  $K^+$ -Ionenselektivität verantwortlich (Heginbotham et al, 92). Vier  $\alpha$ -Untereinheiten in dieser Gruppe werden für einen funktionsfähigen Kanal benötigt. Diese Gruppe bildet einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (Inwardly rectifying potassium channels, Kir-Kanäle). Eine schematische Übersicht über den Aufbau eines Kir-Kanales ist in der Abbildung 1 dargestellt.

In der zweiten und bekanntesten Gruppe befinden sich Kaliumkanäle, deren  $\alpha$ -Untereinheiten jeweils 6 Transmembrandomänen aufweisen, die als S1-S6 bezeichnet werden. Die innere Porenwand wird von den zwei Domänen S5 und S6 gebildet. Zwischen den beiden Transmembrandomänen liegt die H5 (P) Region. Vier  $\alpha$ -Untereinheiten werden für einen funktionsfähigen Kanal benötigt. In dieser Gruppe befinden sich mehrere Untergruppen, wie zum Beispiel die spannungsgesteuerten (voltage-gated) Kv Kanäle, die eag (ether à go-go) Kanäle und die  $Ca^{2+}$  aktivierten Kaliumkanäle. Letztere besitzen eine zusätzliche Transmembrandomäne (S0), so dass der Aminoterminus extrazellulär liegt.



**Abbildung 1: Schema eines Kir-Kanals**

**A:** Integration eines Kir-Kanalproteins ( $\alpha$ -Untereinheit) in der Plasmamembran. Amino- und Carboxyterminus liegen im Cytoplasma. **B:** Aufsicht auf die Kanalpore. Vier Kir-Kanalproteine bilden den vollständigen Kanal. Bei diesem besteht der Kanal aus heterooligomeren Untereinheiten. Gleiche Untereinheiten sind farblich markiert.

Eine dritte Gruppe bilden Kaliumkanäle, die erst in den letzten Jahren gefunden wurden und in der jeweils zwei Transmembrandomänen mit einer zwischen ihnen gelegenen H5 (P) Region in einem Molekül als Tandem hintereinander angeordnet sind. Somit werden nur 2  $\alpha$ -Untereinheiten für einen funktionsfähigen Kanal benötigt. Verschiedene Vertreter dieser Gruppe sind bei Säugtieren zur Zeit bekannt, die in weitere Untergruppen unterteilt werden.

### **1.3 Einwärtsgleichrichtende Kalium-Kanäle (Kir-Kanäle)**

Einwärtsgleichrichtende Kalium-Kanäle (Inwardly rectifying potassium (K) channels, Kir-Kanäle) wurden zum ersten Mal von Katz (1949) im Skelettmuskel beschrieben. Bei elektrophysiologischen Untersuchungen fiel ihr Verhalten auf, weil es sich von den damals schon bekannten spannungsabhängigen Kaliumkanälen (voltage gated potassium channels, Kv-Kanäle) unterscheidet. Die Kir-Kanäle wurden deshalb ursprünglich von Katz als „anormale Gleichrichter“ bezeichnet.

Die „normalen“ spannungsabhängige Kaliumkanäle sind beim Ruhepotential geschlossen und öffnen sich erst bei einer Depolarisation auf Potentiale positiver als  $-50$  mV, wie es zum Beispiel bei Aktionspotentialen geschieht.

Die „anormalen“ Kir-Kanäle schließen sich dagegen bei einer Depolarisation der Zelle und verhindern auf diese Weise einen repolarisierenden Auswärtsstrom von Kaliumionen. Sie sind beim Ruhepotential in der Regel offen. Bei Membranpotentialen negativ des Gleichgewichtspotentials für  $K^+$  Ionen ( $-95$  mV) käme es zu einem Einwärtsstrom von  $K^+$ -Ionen. Solche extremen Hyperpolarisationen werden jedoch unter normalen physiologischen Bedingungen nicht erreicht. Aufgrund ihrer Eigenschaften spielen Kir-Kanäle eine zentrale Rolle in der Stabilisierung des Ruhepotentials, der  $K^+$ -Homöostase, der Steuerung der Insulinsekretion und in der Kontrolle der Erregbarkeit einer Vielzahl von Zellen. Längere Depolarisationsphasen, wie sie z. B. für den Herzmuskel typisch sind, werden durch das Schließen der Kir-Kanäle erst ermöglicht.

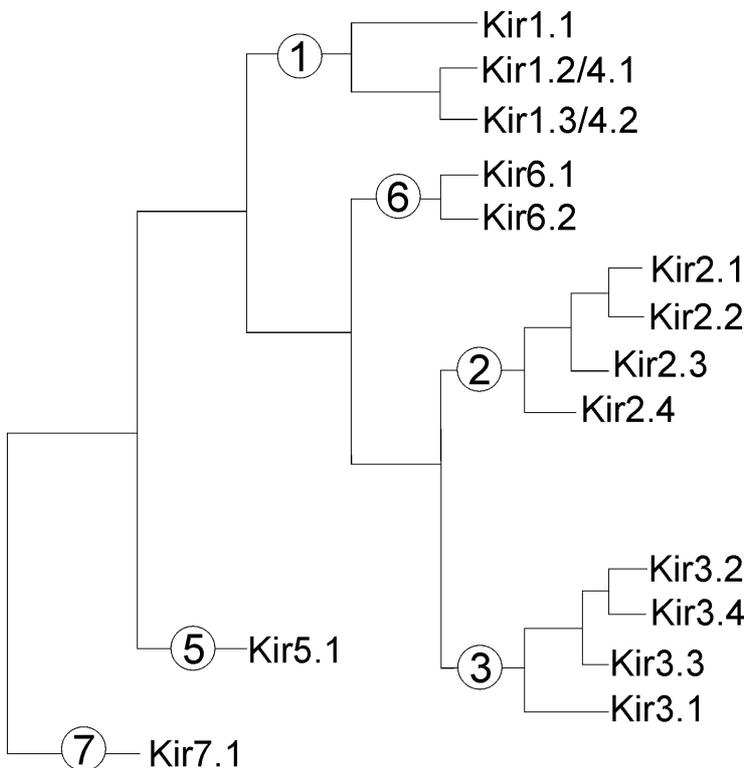
Kir-Kanäle können sowohl in homo- als auch heterooligomerer Form vorliegen. Wenn sich zwei verschiedene Untereinheiten zu einem Heterooligomer zusammenlagern, beträgt die Stöchiometrie 2:2 (Doupnik et al, 95; Silverman et al, 96) und die jeweils gleichen Untereinheiten liegen sich dabei gegenüber (Abbildung 1B). In der Abbildung ist ebenfalls dargestellt, dass die Transmembrandomäne M2 das Lumen der Pore begrenzt, M1 liegt weiter außen (Minor, Jr. et al, 99).

Anders als bei Kv-Kanälen, deren Öffnen durch einen intrinsischen Spannungssensor gesteuert wird, kommt es bei Kir-Kanälen zu keiner Konformationsänderung, sondern zu einem Verschluss der Pore durch intrazelluläres  $Mg^{2+}$  oder positiv geladene Polyamine wie Spermin und Spermidin (Lopatin et al, 94; Fakler et al, 95). Bei Depolarisation blockieren diese Moleküle die Kanalpore und verhindern somit weiteren  $K^+$ -Ionen Ausstrom.

Die Bedeutung der Kir-Kanäle wird bei mehreren Erbkrankheiten sichtbar, bei denen es zu Mutationen von Kir Genen gekommen ist. Beim Menschen sind Mutationen der Kir-Kanäle für mindestens zwei Erkrankungen verantwortlich, das Bartter Syndrom Typ III (Hyperprostaglandin E Syndrom) bei einer Mutation vom Kir1.1 Gen (Simon et al, 96) und eine familiär persistierende infantile Hypoglykämie bei einer Mutation des Kir6.2 Gens (Thomas et al, 96). Eine weitere Erkrankung, die auf einer Kir Mutation beruht, liegt bei der Weaver-Maus vor, bei der das Gen für Kir3.2 eine Punktmutation aufweist (Patil et al, 95).

Kir-Kanäle kommen nicht nur im Skelettmuskel, sondern auch im Herzen, in der glatten Muskulatur, im Pankreas und in den neuronalen sowie nichtneuronalen Zellen des ZNS (Zentrales Nerven-System) vor.

Die bisher bekannten 15 Kir-Kanalprotein-Gene werden nach ihren Sequenzhomologien in 6 verschiedene Gruppen (Kir1, Kir2, Kir3, Kir5, Kir6 und Kir7) unterteilt. Neben den Trivialnamen hat sich für die einzelnen Mitglieder eine einheitliche Nomenklatur nach dem Schema Kirx.y durchgesetzt (Doupnik et al, 95). Mit „x“ wird dabei die Familie und mit „y“ die Untergruppe bezeichnet.



**Abbildung 2: Dendrogramm der Kir-Kanalproteine**

Die Proteine sind nach Sequenzähnlichkeiten in die 6 bekannten Gruppen geordnet worden. Die Vertreter von Kir4 werden mittlerweile der Kir1 Gruppe zugeordnet. Zur Kir3 Gruppe wird auch noch Kir3.5 gezählt (nur beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* gefunden).

(abgewandelt nach Reimann und Ashcroft, 99)

---

Die verschiedenen Gruppen der Kir-Kanäle besitzen unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen. Die nur schwach einwärtsgerichtenden Kir1 Kanäle sind besonders am transepithelialen Ionentransport in der Niere beteiligt. Sie sind aber auch in verschiedenen Gehirnregionen wie z. B. Kortex und Hippocampus nachgewiesen worden (Kenna et al, 94; Shuck et al, 97).

Die stark einwärtsgerichtenden Kir2 Kanäle kommen vor allem im Herzen und im Gehirn, wie z. B. Cerebellum und Hippokampus vor (Nakamura et al, 98; Stonehouse et al, 99). Im Herzen haben sie eine bedeutende Funktion bei der Regulierung des Potentials während der Diastole (Nakamura et al, 98).

Kir6 Kanalproteine bilden mit einer regulatorischen  $\beta$ -Untereinheit, dem Sulfonylharnstoff-Rezeptor (SUR), schwach einwärtsgerichtende ATP-sensitive Kalium-Kanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle), die sowohl im Gehirn als auch im Muskelgewebe und im Pankreas vorkommen. In den  $\beta$ -Zellen des Pankreas regelt der aus Kir6.2 und der akzessorischen Untereinheit SUR1 bestehende  $K_{ATP}$  Kanal die Sekretion von Insulin (Sakura et al, 95).

Die ebenfalls stark einwärtsgerichtenden Kir3-Kanäle (Dascal et al, 93), sind vor allem für die Neurotransmitter- oder Hormon-bedingte Inhibierung von Zellen (s.u.) notwendig. Sie werden direkt über G-Proteine aktiviert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich im Weiteren mit dieser Gruppe von Kaliumkanälen, die im folgenden Kapitel genauer dargestellt werden.

## 1.4 Kir3-Kanäle

Alle Kir3-Kanäle werden von verschiedenen Neurotransmittern über G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert (Tabelle 1). Diese G-Protein regulierten Kir-Kanäle wurden in der Literatur deshalb oft auch als G-protein-gated inwardly rectifying potassium channel (GIRK) bezeichnet. Sie kommen in verschiedenen Regionen, wie Herz, Gehirn und endokrinen Organen vor. So sind sie z. B. für die Verlangsamung des Herzschlages (s.u.) und die Aktivierbarkeit von Neuronen verantwortlich.

**Tabelle 1: Verschiedene Neurotransmitter können Kir3-Kanäle über G-Protein gekoppelte Rezeptoren öffnen.**

<b>Transmitter</b>	<b>metabotroper Rezeptorsubtyp</b>	<b>Literatur:</b>
<b>Acetylcholin</b>	muskarinischer m2	1
<b>GABA</b>	GABA <sub>B</sub>	2
<b>Serotonin</b>	5HT1A	3
<b>Adenosin</b>	P1	4
<b>Enkephalin</b>	Opiat Rezeptoren $\mu$ , $\kappa$ , $\delta$	5
<b>Adrenalin/Noradrenalin</b>	$\alpha$ 2A	6,7
<b>Dopamin</b>	D2, D3, D4	8,9,10,11

1:(Krapivinsky et al, 95); 2:(Slesinger et al, 97); 3:(Karschin et al, 91); 4:(Ruiz-Velasco und Ikeda, 98); 5:(Chen und Yu, 94); 6: (Ruiz-Velasco und Ikeda, 98) ; 7: (Leaney und Tinker, 00); 8:(Werner et al, 95); 9:(Kuzhikandathil et al, 98); 10:(Pillai et al, 98); 11:(Kuzhikandathil und Oxford, 00)

### 1.4.1 G $\beta\gamma$ vermittelte Aktivierung der Kir3-Kanäle

Die G-Protein aktivierten Kir3-Kanäle sind die einzigen bekannten Ionenkanäle, die durch direkte Bindung von G $\beta\gamma$  Untereinheiten (He et al, 99) reguliert werden. Die entsprechenden G $\beta\gamma$ -Untereinheiten gehören der Pertussistoxin sensitiven G $_{i/o}$  Familie an. Jede der vier Untereinheiten einer Kir3-Kanalpore kann mit mindestens einem G $\beta\gamma$  Komplex interagieren. Sie besitzt dafür drei Bindungsdomänen, eine am Amino- und zwei am Carboxyterminus (Yamada et al, 98).

Die Aminosäure Leucin an der Position 333 (Kir3.1) bzw. 339 (Kir3.4) scheint für die Affinität zur G $\beta\gamma$ -Untereinheit von Bedeutung zu sein. Mutation dieser Aminosäure (zu Glutaminsäure) führt zu einer deutlichen Abnahme im Bindungsvermögen (He et al, 99). Für die Kanalaktivierung ist mehr als ein G $\beta\gamma$ -Dimer nötig (Karschin et al, 91). Nicht bekannt ist aber, ob für die maximale Aktivierung alle Domänen besetzt sein müssen.

### 1.4.2 Assoziation mit anderen Proteinen

Kir3-Proteine sind mit Integrinen assoziiert, interessanterweise scheinen sie jedoch nicht über das R-G-D Motiv an die Integrine zu binden. Dieses ist zwar bei allen Kir3-Kanalproteinen unmittelbar nach der M1 Transmembrandomäne vorhanden (Dascal, 97; McPhee et al, 98; He et al, 99) und liegt (siehe Abbildung 1) extrazellulär, jedoch konnte durch Mutationsanalysen des Motivs gezeigt werden (Ivanina et al, 00), dass eine andere Bindungsstelle an den Kir3-Proteinen vorhanden sein muss.

Des Weiteren weisen sowohl Kir3.2 als auch Kir3.3 am Carboxyterminus die Aminosäuresequenz E-S-K-V auf. Diese Sequenz ist notwendig für die Interaktion mit Proteinen, welche über Ankerproteine, die eine PDZ-Domäne (PSD-95/SAP Proteine) besitzen, mit dem Cytoskelett verankert sind. Ob jedoch Kir3.2 und Kir3.3 so verankert werden, ist ungeklärt (Hibino et al, 00). Eine Koimmunopräzipitation der Kir3 Proteine mit SAP90/PSD95 gelang bis jetzt noch nicht (Nehring et al, 00).

Kir3 Proteine besitzen zusätzlich Phosphorylierungs- und Glycosylierungsstellen. So wird der native, durch Acetylcholin aktivierte Kalium-Kanal im Herzen durch Phosphorylierung der Kir3.1 Untereinheit erst in einen durch G $\beta\gamma$  aktivierbaren Zustand überführt. Es ist aber nicht bekannt, an welcher Stelle die Phosphorylierung genau erfolgt (Medina et al, 00). Ebenfalls bei

Kir3.1 existiert an der Aminosäureposition 119 (Asparagin) eine mögliche Glycosylierungsstelle (Dascal, 97).

Für das Öffnen der Kir3-Kanalpore sind Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) und Na<sup>+</sup>-Ionen essentiell. Allein durch die direkte Bindung von PIP<sub>2</sub> kommt es zu einer, wenn auch langsamen (im Bereich einiger Minuten), vollständigen Öffnung des Kanales (Huang et al, 98; Sui et al, 98). Gβγ stabilisiert diese Interaktion zwischen den Kanalproteinen und PIP<sub>2</sub>.

Zusätzlich benötigen Kir3-Kanäle zur Aktivierung auch noch Na<sup>+</sup>-Ionen, um die bei ihnen schwächere Interaktion mit PIP<sub>2</sub> zu stabilisieren (Zhang et al, 99). Eine Asparaginsäure an der Position 226 (Kir3.2) im proximalen Bereich nach der M2 Domäne muss in direktem Kontakt mit Na<sup>+</sup>-Ionen gelangen. Dadurch kommt es zu einer Reduktion des negativen elektrostatischen Potentials und das anionische PIP<sub>2</sub> kann sich leichter an zwei unmittelbar benachbarte Arginine anlagern (Ho und Murrell-Lagnado, 99a). Von den vier Kir3-Kanalproteinen weist nur Kir3.1 an der betreffenden Stelle kein Asparaginsäure, sondern Asparagin auf und kann auch keine Interaktion mit Na<sup>+</sup>-Ionen eingehen (Ho und Murrell-Lagnado, 99b).

### 1.4.3 Kir3 Untereinheiten

Von den fünf verschiedenen Kir3-Kanalproteinen kommen vier bei Säugetieren vor (Kir3.1-Kir3.4). Eine fünfte (Kir3.5) ist beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* gefunden worden (Hedin et al, 96). Zusätzlich existieren von Kir3.1 und Kir3.2 mehrere Splice-Varianten (mit den Suffixen A, B, C usw. gekennzeichnet). In der Kir3 Gruppe existieren sowohl homooligomere als auch heterooligomere Kanäle. Die heterooligomeren Kanäle bestehen stets aus der Kombination von Kir3.1 mit einem der anderen Kir3-Kanäle. Bis auf wenige Ausnahmen (Fakler et al, 96; Pessia et al, 96) sind die Kir-Kanäle der anderen Gruppen überwiegend homooligomer.

Kir3.1 nimmt eine Sonderrolle unter den Kir3-Kanalproteinen ein. Zum einen besitzt Kir3.1 einen langen carboxyterminalen Abschnitt, der bei allen anderen Kir3 Proteinen fehlt und weist zum anderen auch keine „targeting“ Sequenz auf, die es den anderen Kir3-Kanalproteinen erlaubt, auch alleine an die Plasmamembran transportiert zu werden (Kennedy et al, 99). Es sind keine funktionsfähigen homooligomeren Kir3.1 Kanäle bekannt. Im Gegensatz dazu können Kir3.2, Kir3.3 und Kir3.4 sowohl heterooligomer als auch homooligomer funktionsfähige Kanäle bilden (Corey und Clapham, 98; Kennedy et al, 99).

## 1.4.4 Biologische Bedeutung von Kir3

### 1.4.4.1 Kir3 Protein außerhalb des ZNS

Kir3-Kanäle sind außerhalb des ZNS zum Beispiel im Herzen und in endokrinen Organen nachgewiesen worden. In den Schrittmacherzellen im Atrium des Herzens verlangsamen Kir3-Kanäle die Herzschlagfrequenz. In autorhythmischen Schrittmacherzellen kommt es im Anschluß an eine Repolarisierungsphase zu einer langsamen Depolarisation, bis das Schwellenpotential erreicht ist und ein neues Aktionspotential ausgelöst werden kann. Wenn aber durch Acetylcholinausschüttung ein muskarinischer m2 Rezeptor aktiviert wird, kommt es über die Aktivierung einer G-Protein Signalkaskade zur Aktivierung eines aus Kir3.1 und Kir3.4 bestehenden heterooligomeren Kir-Kanals.  $K^+$  Ionen strömen aus und verlangsamen die Geschwindigkeit der Depolarisation. Das Schwellenpotential wird später erreicht und es kommt zu einer Erniedrigung der Aktionspotentialfrequenz und somit zu einer Verlangsamung des Herzschlages.

Neben diesen heterooligomeren Kir3.1/3.4-Kanälen existieren auch homooligomere Kir3.4-Kanäle im Atrium, es ist jedoch nicht bekannt, ob auch diese über den muskarinischen m2-Rezeptor aktiviert werden (Corey und Clapham, 98). Ein anderes Beispiel für die Funktion von Kir3-Kanälen ist die Hemmung der Glucagon Sekretion in den  $\alpha$ -Zellen des Pankreas. Durch Somatostatin wird ein Kir3-Kanal geöffnet, der möglicherweise ein heterooligomeres Kanal ist, an dem Kir3.1 nicht eine der Untereinheiten bildet, sondern der sich aus Kir3.2c und Kir3.4 zusammensetzt (Yoshimoto et al, 99).

### 1.4.4.2 Kir3-Proteine im ZNS

Die inhibitorische Wirkung vieler Neurotransmitter beruht nicht selten auf der Aktivierung von Kir3-Kanälen (siehe Tabelle 1). Die Kenntnis über ihre genaue Lokalisation im ZNS ist deshalb für das Verständnis ihrer Bedeutung unabdingbar. Auch wenn mRNA und Proteine von allen vier Kir3-Kanälen im ZNS nachgewiesen worden sind, ist ihre Lokalisation nur ungenau bekannt. Die Lokalisation von Kir3.1 und Kir3.2 im ZNS ist sehr ähnlich. Bei einer Punktmutation (Weaver-Maus) oder gar dem kompletten Fehlen von Kir3.2 in Knock-out-Mäusen kommt es zu einem drastischen Rückgang von Kir3.1 Protein (Signorini et al, 97). Verschiedene Autoren

gehen davon aus, dass die Mehrzahl aller Kir3-Kanäle im Gehirn aus diesen beiden Untereinheiten besteht (Kobayashi et al, 95; Karschin et al, 96).

#### **1.4.4.3 Kir3 Verbreitung im ventralen Mesencephalon**

Im ventralen Mesencephalon ist nur wenig Kir3.1 mRNA (DePaoli et al, 94) und Protein (Liao et al, 96) nachgewiesen worden. Kir3.2 ist jedoch sowohl als mRNA als auch als Protein sehr prominent in den dopaminergen Neuronen des ventralen Mesencephalons vorhanden (Karschin et al, 96). Ein heterooligomerer Kir3.1/3.2 Kanal erscheint in dieser Region wegen der sehr ungleichmäßigen Verteilung von Kir3.1 und Kir3.2 deshalb sehr unwahrscheinlich. Es ist eher möglich, dass in diesem Bereich Kir3.2 Splicevarianten einen homooligomeren Kanal bilden (Inanobe et al, 99a).

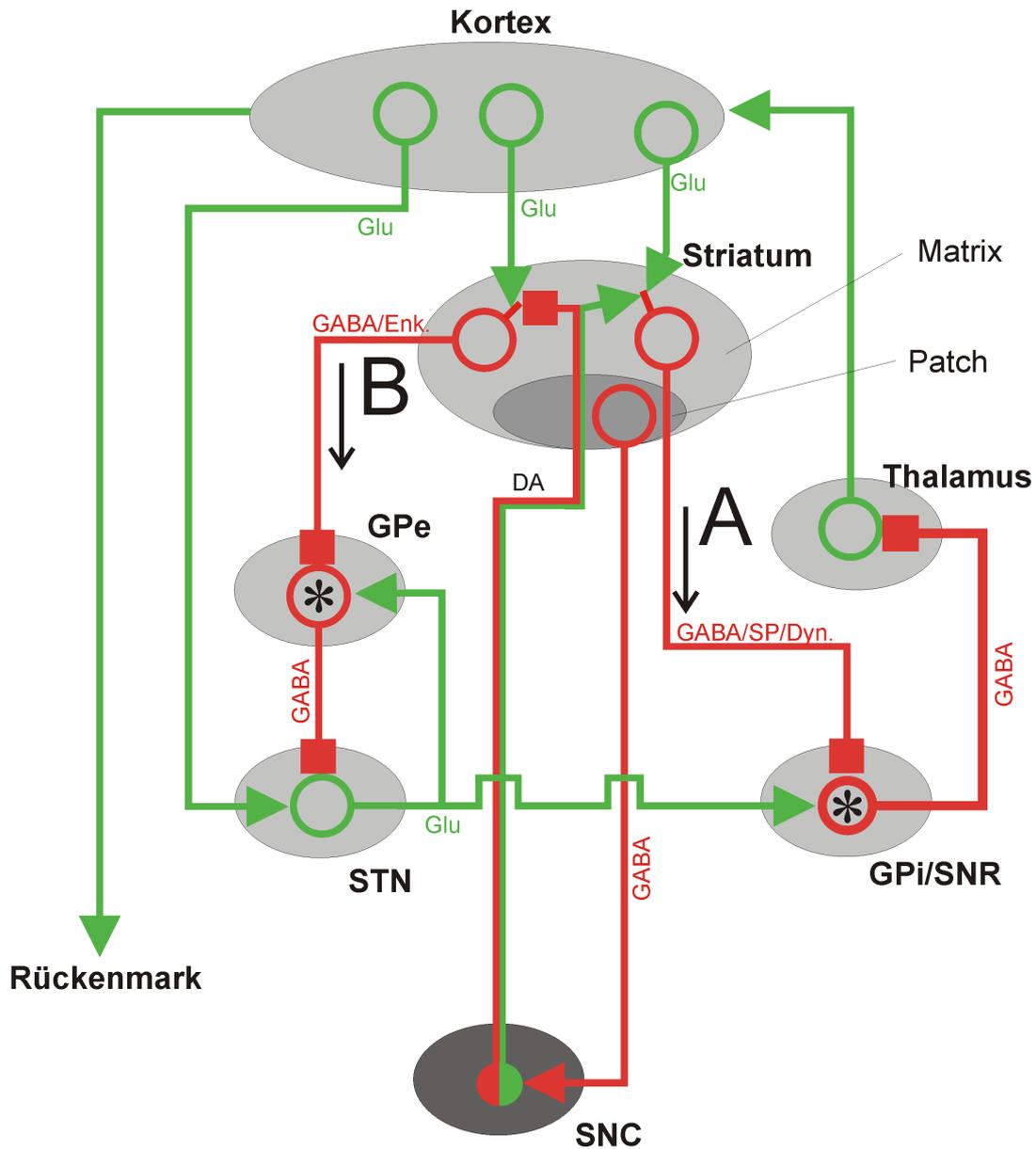
Über die Lokalisation der anderen Kir3-Kanalproteine im ventralen Mesencephalon existieren nur wenige Angaben. Die vorliegenden Ergebnisse lassen jedoch schließen, dass Kir3.3 und Kir3.4 nicht oder nur im geringen Maße vorhanden sind (Karschin et al, 96; Spauschus et al, 96; Iizuka et al, 97; Murer et al, 97).

### **1.5 Basalganglien und ventrales Mesencephalon**

Unter den Basalganglien wird eine Gruppe von Kerngebieten im Gehirn zusammengefasst, die zum Telencephalon, Diencephalon oder Mesencephalon gehören und in funktionell enger Beziehung zueinander stehen. Zu den Basalganglien gehören neben dem dorsalen und ventralen Striatum (Nucleus caudatus und Putamen), Nucleus accumbens, Pallidum (pars intern und pars extern), und Nucleus subthalamicus zwei im ventralen Mesencephalon gelegene Gebiete, die Substantia nigra pars compacta (SNc) (Vicq D'Azyr und F., 86) und die Area tegmentalis ventralis (VTA) (Tsai, 25).

Sie sind sowohl an motorischen als auch an psychischen (limbisches System) Funktionen beteiligt. Dazu gibt es zahlreiche Projektionsbahnen, die getrennt voneinander, aber parallel verlaufen. Die Bahnen bilden in sich geschlossene Neuronenkreise (Schleifen). Sie ziehen vom Kortex kommend durch die Basalganglien und über den Thalamus wieder zurück in den Kortex (Alexander et al, 90).

Im Folgenden soll am Beispiel der motorischen Schleife der Weg der Projektionen durch die Basalganglien vorgestellt werden (Abbildung 3). Aus verschiedenen Arealen des Kortex (vor allem der primär motorische und der supplementmotorische Kortex) projizieren glutamaterge Projektionsneurone zur Eingangsstelle in die Basalganglien, das Putamen (Teil des Striatums).



**Abbildung 3: Schema der motorischen Basalganglienschleifen**

Mit grüner Farbe und den Pfeilspitzen sind die erregenden Bahnen dargestellt. Hemmende Bahnen sind mit roter Farbe und Quadraten an ihren Enden abgebildet. Der direkte Weg ist mit **A** und der indirekte Weg ist mit **B** gekennzeichnet. Sterne kennzeichnen spontan aktive Zentren. (abgewandelt nach Alexander et al., 90)

Für die motorischen Schleifen ist das Putamen der wichtigste Eingang in die Basalganglien. Die Projektionen in das Putamen sind somatotopisch angeordnet. Diese Einteilung der Projektionen bleibt nicht nur im Putamen, sondern auch in allen darauf folgenden Stationen erhalten.

Aus dem Putamen führen die Projektionen über einen **direkten Weg** und über einen **indirekten Weg**.

Der **direkte Weg** führt vom Putamen zur Pars interna des Globus pallidus (GPi) und der Substantia nigra pars reticulata (SNr), zum Thalamus und über diesen zurück zum Kortex.

Der **indirekte Weg** führt vom Putamen über den pars externa des Globus Pallidus (GPe) zum Nucleus subthalamicus (STN). Von dort existiert eine Rückkopplung direkt wieder zurück zum GPe. Weitere Projektionen führen vom STN zum Globus pallidus pars interna (GPi) und der Substantia nigra pars reticulata (SNr). Von dort laufen direkter und indirekter Weg wieder gemeinsam über den Thalamus zurück zum Kortex.

Voraussetzung für die Ausführung einer Bewegung ist, dass es über den Thalamus zu einer Aktivierung des Kortex und damit zum Ablauf von Bewegungsprogrammen (bei motorischen Schleifen) kommt. Die GABAergen Neurone des Globus pallidus pars interna und der Substantia nigra pars reticulata sind jedoch tonisch aktiv und inhibieren den Thalamus konstant. Eine Bewegung kann erst dann ausgeführt werden, wenn auf dem **direkten Weg** die GABA- und SP-enhaltenden Neurone des Striatums durch den kortikalen Eingang aktiviert werden und den GPi hemmen, so dass der Thalamus disinhibiert wird. Die striatalen Neurone benötigen für ihre Aktivierung durch den Kortex die gleichzeitige Erregung ihrer metabotropen D1-Rezeptoren durch die dopaminergen Neurone des ventralen Mesencephalons. Beide Synapsen sind an den Dornfortsätzen der striatalen Neurone räumlich unmittelbar benachbart (siehe Abbildung 3).

Diese am Beispiel der motorischen Schleife vorgestellten Wege durch die Basalganglien sind bei allen Schleifen im Prinzip gleich. Eine Schlüsselrolle bei der Modulation der Schleifen nehmen die dopaminergen Neurone der VTA (bei psychischen Schleifen) und der SNc (bei motorischen Schleifen) im ventralen Mesencephalon ein. Drei Gruppen von dopaminergen Neuronen sind im Mesencephalon bekannt, die mit A8 (Retrorubrales Feld), A9 (SNc) und A10 (VTA) bezeichnet werden (Dahlström und Fuxe, 64).

Der **indirekte Weg** weist eine zusätzliche synaptische Verschaltung auf und wirkt bewegungshemmend. Eine wichtige Station auf diesem Weg sind die glutamatergen Neurone des Nucleus subthalamicus. Sie wirken excitatorisch auf die GABAergen Neurone von GPi und SNr, so dass die Inhibition des Thalamus verstärkt wird. Der Nucleus subthalamicus wird von den GABAergen und spontan aktiven Neuronen des GPe inhibiert und eine Inhibition dieses Inhibitors durch GABA und enkephalinerge striatale Neurone führt zur Disinhibition des Nucleus subthalamicus. Die dopaminergen Neurone des ventralen Mesencephalons hemmen die striatalen Neurone des indirekten Weges über deren metabotrope D2-Rezeptoren.

**Direkter** und **indirekter Weg** haben somit gegensätzliche Wirkungen auf die Motorik. Während über den direkten Weg eine Bewegung aus dem Repertoire aller möglichen Bewegungsabläufe ausgewählt wird, werden zur gleichen Zeit über den indirekten Weg andere Bewegungsabläufe unterdrückt.

Die Rolle der dopaminergen Neurone des ventralen Mesencephalons ist vergleichbar mit der eines Dirigenten vor einem Orchester. Aus einer Vielzahl von möglichen Abläufen werden einzelne Schleifen ausgewählt und aktiviert, während andere stumm bleiben müssen.

Wichtige motorische und psychische Erkrankungen können durch Störungen in den Basalganglienschleifen verursacht werden. Bei den motorischen Erkrankungen sind Morbus Parkinson und die Chorea Huntington (Veitstanz) an erster Stelle zu nennen.

Die Parkinson Erkrankung als langsam fortschreitende Hypokinese und Akinesie mit Ruhe- und Haltungstremor äußert sich ab dem mittleren Lebensalter. Ursache ist das selektive Absterben dopaminergener Neurone in der SNc im ventralen Mesencephalon, während die dopaminergen Neurone der VTA mehrheitlich überleben. Durch diesen Zellverlust können die GABAergen striatalen Neurone nicht mehr aktiviert werden, die motorische Schleife ist unterbrochen und die Aktivierung einer Bewegung bleibt gehemmt.

Die zweite wichtige motorische Erkrankung ist Chorea Huntington, die im Gegensatz zur Parkinson Erkrankung dominant erblich ist und zu Hyperkinese führt. Bei dieser chronisch fortschreitenden Erkrankung, deren Manifestation zwischen den 25. und 55. Lebensjahr erfolgt, kommt es bei dem Betroffenen zu unwillkürlichen und unphysiologischen Muskelkontraktionen. Ursache bei dieser Erkrankung ist eine Reduzierung des Neuropeptids Enkephalin auf dem indirekten Weg. Enkephalin ist neben GABA der inhibitorische Neurotransmitter auf dem Weg vom Striatum zum Globus Pallidus externa. Der spontan aktive Globus Pallidus externa wird

weniger gehemmt und kann somit den exzitatorischen Nucleus subthalamicus stärker inhibieren. Das bedeutet, dass der indirekte Weg schwächer wird und unbeabsichtigte Bewegungen möglicherweise nicht mehr unterdrückt werden können.

Auch einige psychische Erkrankungen werden auf Störungen in den Basalganglienschleifen zurückgeführt. Dieser Bereich der Basalganglien wird dem limbischen System zugeordnet. So scheint bei an Schizophrenie erkrankten Patienten eine der Ursachen möglicherweise in einer Überfunktion der dopaminergen Modulation zu liegen (Grace et al, 97). Ein Beispiel eines antipsychotischen Medikaments ist Haloperidol, das als ein Dopamin D1 und D2 Rezeptor Antagonist wirkt. Bisherige pharmakologische Therapien führen dabei als Nebenwirkung stets auch zu einer Beeinträchtigung der Motorik.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Die dopaminergen Neurone des ventralen Mesencephalons sind wichtige regulatorische Stationen in den parallel verlaufenden motorischen und psychomotorischen Basalganglienschleifen.

Störungen in den Basalganglienschleifen, die zu wichtigen psychischen Erkrankungen führen, haben ihre Ursache oft in diesen dopaminergen Neuronen. Bei bisherigen Therapieansätzen ist es leider nicht möglich, selektiv nur Neurone der SNc oder der VTA zu beeinflussen, da sich die Neuronen beider Gebiete sehr ähneln. Als Nebenwirkung werden daher stets die dopaminergen Neurone der jeweils anderen Region mit betroffen. So führt die bisherige Behandlung von an Schizophrenie erkrankten Patienten auch zu einer Beeinträchtigung der Motorik, die sich als schwere Dyskinesien äußern.

Es ist deshalb von großem Interesse, Wege zu finden, selektiver zwischen den Neuronen in VTA und SNc unterscheiden zu können. Eine Möglichkeit zur Unterscheidung könnten die Ionenkanäle der Neuronen sein.

Eine zukünftige pharmakologische Therapie neuronaler Erkrankungen über die Beeinflussung von Ionenkanälen erscheint prinzipiell möglich. Kaliumkanäle sind besonders geeignet, da sie die häufigsten und vielfältigsten aller Ionenkanäle sind. Bei der Behandlung von Diabetes mellitus werden seit langem in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas die aus Kir6.2 und der akzessorischen Unter-einheit SUR1 bestehenden  $K_{ATP}$  Kanäle beeinflusst.

Von den Kir3-Kanälen ist bis jetzt nur Kir3.2-Protein in den dopaminergen Neuronen des ventralen Mesencephalons eindeutig nachgewiesen worden. Bei diesem Kanal weiß man, dass er zumindest bei der Maus nicht gleichmäßig in SNc und VTA verteilt ist. So läßt sich dieser lichtmikroskopisch nicht in den dopaminergen Neuronen des medial gelegenen Subnucleus interfascicularis nachweisen (Schein et al, 98). Wenn sich dieser Befund auch auf andere Spezies erstrecken sollte, dann könnten auch Kir3-Kanäle bei zukünftigen Therapien pharmakologisch beeinflusst werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, folgende Punkte zu klären:

- Welche der Kir3-Kanalproteine kommen im ventralen Mesencephalon der Ratte vor?
- Wie ist ihre genaue subzelluläre Lokalisation (somatodendritisch versus axonal)?
- Gibt es Unterschiede in ihrer Lokalisation zwischen den dopaminergen Neuronen des motorischen und limbischen Systems?