

Aus dem Institut für Angewandte Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. J. R. Schwarz)
Zentrum für experimentelle Medizin,
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,
Universität Hamburg

**Immunzytochemischer Nachweis von *ether-à-go-go*-
related-gene Kaliumkanaluntereinheiten in nativem
Gewebe und heterologen Expressionssystemen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

**Natalie Stamm
aus Warendorf**

Freie und Hansestadt Hamburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. C. K. Bauer

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. J. R. Schwarz

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. U. Schumacher

Abkürzungen

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2. Einleitung.....	3
2.1 Erg-Kanäle.....	3
2.1.1 Allgemeines und Struktur	3
2.1.2 Klinische Relevanz und pharmakologische Eigenschaften	5
2.1.3 Verteilung von erg-Kanaluntereinheiten.....	6
2.2 Bulbus Olfactorius	8
3. Material und Methoden	12
3.1 Zellkultur (Institut für Angewandte Physiologie).....	12
3.1.1 CHO-Zellkultur.....	12
3.1.2 HEK-293 Zellkultur	13
3.2 Bulbus Olfactorius Primärkultur (Zentrum für Molekulare Neurobiologie)..	14
3.2.1 Lösungen und Medien.....	14
3.2.2 Kultivierung und Präparation.....	15
3.3 Transfektion	16
3.3.1 Plasmide/Klone	16
3.3.2 Lösungen und Medien.....	17
3.3.3 Methode	17
3.4 Immunzytochemie.....	18
3.4.1 Antikörper	19
3.4.1.1 Primärantikörper	19
3.4.1.2 Sekundärantikörper	25
3.4.2 Lösungen und Medien.....	26
3.4.3 Methode	27
3.4.3.1 Heterologe Expressionssysteme.....	27
3.4.3.2 Natives Gewebe	28
3.4.3.3 Eindeckeln.....	29
3.4.3.4 Mikroskopische Auswertung	30
3.5 Verzeichnis der Hersteller.....	30
4. Ergebnisse.....	32
4.1 Immunzytochemie an heterologen Expressionssystemen	32
4.1.1 erg1-Antikörper.....	32
4.1.1.1 Anti-Kv11.1 (erg1) Antikörper, #APC016 (Alomone Labs).....	33
4.1.1.2 Anti-HERG Antikörper, #APC062 (Alomone Labs).....	35
4.1.1.3 Anti-HERG Antikörper (H175) IgG Antikörper, sc20130 (Santa Cruz).....	41
4.1.2 erg2-Antikörper.....	42
4.1.2.1 CR1-Antikörper (Eigenproduktion).....	43
4.1.2.2 CR2-Antikörper (Eigenproduktion).....	49
4.1.2.3 Anti-erg2 Antikörper, #APC114 (Alomone Labs)	51
4.1.3 erg3-Antikörper.....	52
4.1.3.1 TB1-Antikörper (Eigenproduktion).....	52
4.1.3.2 TB2-Antikörper (Eigenproduktion).....	55
4.1.4 Kreuzreaktionen.....	59

4.2 Immunzytochemie des Nativen Gewebes (Bulbus olfactorius).....	67
4.2.1 Darstellung der erg1- Kaliumkanaluntereinheit.....	69
4.2.2 Darstellung der erg2- Kaliumkanaluntereinheit.....	71
4.2.3 Darstellung der erg3- Kaliumkanaluntereinheit.....	73
5. Diskussion	75
5.1 Zusammenfassung und Zweck der Arbeit.....	75
5.2 Eignung des Expressionssystems	76
5.3 Eignung einzelner Antikörper in heterologen Expressionssystemen.....	78
5.3.1 Getestete Antikörper gegen erg1	78
5.3.2 Getestete Antikörper gegen erg2	79
5.3.3 Getestete Antikörper gegen erg3	80
5.4 Anwendung der Antikörper für Färbungen nativer erg-Kanäle	81
6. Zusammenfassung	86
7. Literaturverzeichnis	88
8. Danksagung	97
9. Lebenslauf	98
10. Erklärung	100

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BSA	bovines Serum Albumin
cDNA	zyklische Desoxyribonucleinsäure
C-Terminus	carboxyterminales Ende eines Proteins
CHO	Chinese hamster ovarian
DHPG	(S)-3,5-Dihydroxyphenylglycin, ein selektiver mGluR1 Agonist
DMEM	Dulbecco´s modified eagle medium
EBSS	Earl´s balanced salt solution
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
erg	<i>ether-à-go-go</i> -related gene
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAD65/67	Glutamatdecarboxylase
GST	Glutathion-S-Transferase
HEK	human embryonic kidney
herg	human <i>ether-à-go-go</i> -related gene
ICC	Immunzytochemie
IHC	Immunhistochemie
Lsg.	Lösung(en)

M/T-Zellen	Mitral- und Tufted-Zellen in Kultur. Hier können die beiden Zellarten nicht unterschieden werden.
MEM	minimal essential medium
merg	Maus <i>ether-à-go-go</i> -related gene analog
mGluR1	metabotroper Glutamatrezeptor vom Subtyp 1
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
N-Terminus	aminoterminales Ende eines Proteins
PAK	Primärantikörper
PBS	Phosphatpuffer: phosphate-buffered saline
PSG	Mischung aus Penicillin, Streptomycin und Glutamin
reg	Ratten-analog <i>ether-à-go-go</i> -related gene
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SAK	Sekundärantikörper
TRH	Thyreotropin-releasing Hormone
UpM	Umdrehungen pro Minute
Verd.	Verdünnung(en)
Vgl.	Vergleiche
WB	Western blotting

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

In dieser Arbeit soll die Qualität verschiedener Antikörper gegen die Kaliumkanaluntereinheiten erg1, erg2 und erg3 in heterologen Expressionssystemen zur Eignung für den immunzytochemischen Einsatz ausgetestet werden.

Kaliumkanäle sind essentiell für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials in erregbaren Zellen. Sie sind beteiligt an sekretorischen Prozessen und der Signalübertragung an elektrisch erregbaren Membranen (Pongs, 1990). Erg-Untereinheiten der Kaliumkanäle sind spannungsgesteuerte, funktionell einwärts rektifizierende Kanäle.

Um die funktionelle Bedeutung der erg-Kaliumkanaluntereinheiten im Gehirn zu untersuchen, muss ihre Lokalisation auf Proteinebene bekannt sein, wozu spezifische Antikörper notwendig sind. Während die Untereinheiten erg2 und erg3 ausschließlich in neuronalem Gewebe exprimiert sind, ist im Gegensatz hierzu der Kaliumkanal erg1 zusätzlich in verschiedenen nicht neuronalen Geweben exprimiert (Farrelly et al., 2003; Shoeb et al., 2003; Wymore et al., 1997). Ihre physiologische Funktion ist am besten am Herzen nachvollzogen, wo erg1-Kanaluntereinheiten für die Beendigung des Herzaktionspotential zuständig sind und eine reichhaltige Pharmakologie aufweisen (Mitcheson et al., 2000). Die Expression verschiedener erg-Untereinheiten wurde bereits in mehreren Regionen des Gehirns, einschließlich im Hippocampus und im Bulbus olfactorius nachgewiesen. Insbesondere konnten die Mitralzellen des Riechkolbens mit erg1-, erg2- und erg3- Antikörpern intensiv gefärbt werden (Guasti et al., 2005). Durch die Gegebenheit, dass der Bulbus olfactorius eines der wenigen Gebiete im Gehirn ist, wo explizit alle drei erg-Kanaluntereinheiten exprimiert sind (Guasti et al., 2005; Papa et al., 2003; Saganich et al., 2001), ist er zu einem außerordentlichen Target für die intensive Auseinandersetzung mit neuronalen erg-Kaliumkanaluntereinheiten geworden.

Immunzytochemische Färbungen mittels verschiedener Antikörper, welche gegen die erg-Kaliumkanaluntereinheiten gerichtet sind, beinhalten den größten Teil dieser Arbeit.

Dabei kommen sowohl von Firmen erworbene als auch Antikörper aus eigener Herstellung unseres Labors zum Einsatz. Anschließend sollen ausgewählte geeignete Antikörper zur Lokalisation von erg-Kanaluntereinheiten in Zellen des Bulbus olfactorius eingesetzt werden.

Die funktionelle Expression von erg-Kanälen ist elektrophysiologisch mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik (Hamill et al., 1981), sowie über Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktionen (Monyer & Jonas, 1995) kürzlich in Mitralzellen beschrieben worden (Hirdes et al., 2009).

2. Einleitung

2.1 Erg-Kanäle

2.1.1 Allgemeines und Struktur

Erg-Kanäle sind spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, die einwärts rektifizierende K^+ -Ströme vermitteln. Auf diese Weise sind sie bei einigen Zellen für die Repolarisation zuständig oder tragen so zum Ruhemembranpotential bei. Sie wurden zunächst von Mutanten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* geklont. Unter Anästhesie mit Äther machten diese Fliegen Beinbewegungen, die an einen „Go-Go-Tanz“ erinnerten (Warmke et al., 1991). So kam der Name *ether-à-go-go*-related gene Kanal zustande. Es war der erste Hinweis darauf, dass erg-Kanäle neuronale Erregbarkeit modulieren.

Erg-Kanäle gehören zu den EAG-Kanälen (*ether-à-go-go*-gene, s. **Abb. 1**), eine Untergruppe der spannungsabhängigen Kaliumkanäle, die wiederum in drei Subklassen unterteilt werden kann (vgl. **Abb. 1**):

- *eag* (*ether-à-go-go*)
- *erg* (*eag*-related)
- *elk* (*eag*-like, Warmke & Ganetzky, 1994; Bauer & Schwarz, 2001)

Bei den EAG-Kanälen handelt es sich um spannungsabhängige Kaliumkanäle mit sechs Transmembrandomänen, die sich als Tetramere zusammenlagern. Sie besitzen cytoplasmatische C- und N-Termini. Die ersten 135 Aminosäuren des N-Terminus gelten als eine besondere Eigenschaft der EAG-Kaliumkanäle (Warmke & Ganetzky, 1994), die bei keinen anderen Kaliumkanälen vorkommt. Ihre genauere Bedeutung ist bisher nicht vollständig geklärt, aber sie nimmt bei der Deaktivierung dieser Kanäle eine wichtige Rolle ein (Schönherr & Heinemann, 1996; Spector et al., 1996). So deaktivieren *erg*-Kanäle, bei denen der N-Terminus deletiert wurde, deutlich schneller als Wildtyp-Kanäle (Schönherr & Heinemann, 1996; Spector et al., 1996). Aufgrund der Ähnlichkeit dieser Domäne mit Per-Arnt-Sim-Domänen (Morais Cabral et al., 1998), die in anderen

Proteinen als O₂-Sensor fungieren (Pellequer et al., 1999), wurde eine entsprechende Funktion auch bei den erg-Kanälen diskutiert (Tagliatalata et al., 1997; Overholt et al., 2000; Zhang et al., 2003). Außerdem ist für diese Familie die Aminosäuresequenz GFGN typisch, die in der Porenregion als Selektivitätsfilter dient, und auch typisch ist das Vorhandensein einer putativen Bindungsdomäne für zyklische Nucleotide (cNBD, s. **Abb. 1**) im C-Terminus (Warmke & Ganetzky, 1994).

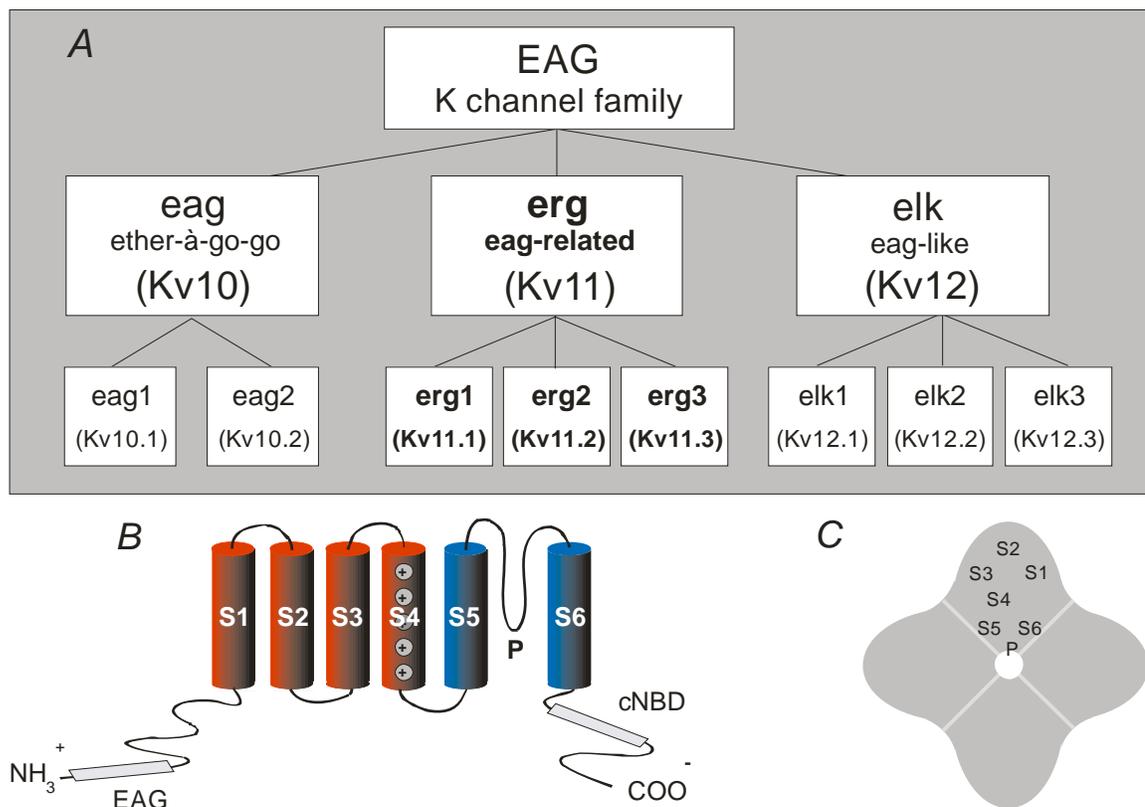


Abb.1: Ether-à-go-go Kaliumkanäle (Quelle: Bauer & Schwarz 2001)

A: Drei Subklassen der eag-Kanäle wie folgt:

eag (*ether-à-go-go*-gene bzw. Kv 10), erg (eag-related-gene bzw. Kv11) und elk (eag-like-gene bzw. Kv12)

B: eag-Kanal Untereinheit bestehend aus 6 Transmembrandomänen (S1-S6), einer Porenregion (P), einer eag-Domäne am N-terminus und einer putativen Bindungsstelle für zyklische Nucleotide (cNBD) am C-terminus. S4 ist der Spannungssensor.

C: Vier α-Untereinheiten, sie bilden einen tetrameren funktionellen Kanal.

1997 wurden im Herzen zwei Splice-Varianten des *erg1*-Kanals, nämlich *erg1a* und *erg1b*, kloniert (Lees-Miller et al., 1997; London et al., 1997). Diesen fehlt ein großer Teil des N-Terminus (Aminosäuren 1-1-376), durch dessen Abwesenheit es zu einer sehr viel schnelleren Deaktivierung des *erg*-Stroms kommt (Lees-Miller et al., 1997; London et al., 1997).

2.1.2 Klinische Relevanz und pharmakologische Eigenschaften

Erg-Kanäle sind beteiligt an der Osmoregulation der K^+ -Homöostase, an sekretorischen Prozessen und an der Signalübertragung an elektrisch erregbaren Membranen (Pongs, 1990). Ihre am besten bekannte Funktion ist ihr Beitrag zur Repolarisation des ventrikulären myokardialen Aktionspotentials. Angeborene Mutationen im *human erg1*-kodierenden Gen (HERG) oder auch erworbene Dysfunktionen (pharmakologisch) der *erg*-Kanäle führen zu einem Anstieg der ventrikulären Aktionspotentialdauer und können auf diese Weise eine Form des langen QT- Syndroms (LQT-2) induzieren (Sanguinetti et al., 1996A), welches zu Arrhythmien und infolgedessen zu den lebensgefährlichen „torsade de pointes“ bis hin zum plötzlichen Herztod führen kann. Insgesamt gibt es sieben verschiedene hereditäre Long-QT-Syndrome beim Menschen (LQT1-LQT7), wobei meist ein bestimmter Kanal in den Membranen der Myokardzellen betroffen ist.

Neben diesem Krankheitsbild wurde auch das Short-QT-Syndrom beschrieben (Gussak et al., 2000), wobei mehr Strom durch einen Kaliumkanal fließt (Brugada et al., 2004). Es kann ebenfalls wie beim LQT-Syndrom zu ventrikulären Arrhythmien und plötzlichen Todesfällen führen. Dieser genetische Defekt führt bereits schon im Säuglingsalter zum Tod. Aus diesem Grunde wird ein Zusammenhang mit dem plötzlichen Säuglingstod diskutiert (Brugada et al., 2004; Siri & Torleiv, 2004).

Erg-Kanäle haben außergewöhnliche pharmakologische Eigenschaften. Sie können spezifisch mit dem Methansulfonanilid E-4031 (einem Klasse III-Antiarrhythmikum), mit WAY 123,398 und Dofetilid blockiert werden (Snyders & Chaudhary, 1996;

Sanguinetti et al., 1995), sowie auch mit Ergotoxin (einem Gift aus Skorpionen; Gurrola et al., 1999). Diese Substanzen sind experimentell von Bedeutung, um einzelne erg-Ströme von anderen nativen Strömen zu isolieren. Viele Arzneimittel, wie zum Beispiel H1-Antihistaminika, Makrolidantibiotika, Fluorchinolone (Gyrasehemmer) und Antiemetika, blockieren den erg-Kanal unspezifisch. Bei den Chinolonen wurde festgestellt, dass bestimmte Nebenwirkungen in Zusammenhang mit gewissen Bestandteilen des Chinolonrings stehen (Domagala, 1994). Ob diese Wirkstoffe auch zu einer klinischen Symptomatik führen, hängt von individuellen Patientendaten ab. Ebenso kann die Kombination mehrerer, auch bereits nur geringgradig blockierender Arzneimittel schließlich zu Symptomen führen. Allerdings haben die hervorgerufenen Nebenwirkungen in der Vergangenheit oft zu einem Widerruf der Zulassung und zu einer Rücknahme einiger dieser Medikamente vom Markt geführt.

2.1.3 Verteilung von erg-Kanaluntereinheiten

Nachdem drei verschiedene erg-Kanäle kloniert wurden, konnten alle drei Untereinheiten im Zentralnervensystem und in anderen erregbaren Geweben nachgewiesen werden (Shi et al., 1997; Wymore et al., 1997; Papa et al., 2003; Bauer & Schwarz, 2001), wo sie eine deutlich ausgeprägte, jedoch vielseitig überlappende Verteilung zeigten (Guasti et al., 2005; Papa et al., 2003; Saganich et al., 2001). Zum Beispiel sind die erg-Kanäle maßgeblich an der Regulation der TRH-abhängigen Prolaktinsekretion in der Adenohypophyse beteiligt (Bauer et al., 1998). Hier werden die hormonausschüttenden laktotrophen Zellen (Corette et al., 1996; Schäfer et al., 1999) durch das TRH blockiert, was zu einer Depolarisation mit anschließender Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz führt (Barros et al., 1997). Durch den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration folgt eine vermehrte Sekretion von Prolaktin. Die intrazelluläre Signalkaskade, die die Verringerung des erg-Stroms auslöst, ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (Schledermann et al., 2001). Im Magen-Darm-Trakt haben die erg1-Kanäle bei der Regulation der Peristaltik und des Tonus der glatten Muskulatur der Pfortadermyozyten (Ohya et al., 2002), der Gallenblase und des Dünndarms (Farrelly et al., 2003; Lillich et

al., 2003; Parr et al., 2003) eine wichtige Funktion. Akbarali et al. (1999) isolierten einen funktionellen erg-Strom aus der Ringmuskulatur der Speiseröhre des Opossums. Über das Vorkommen einer nur in der glatten Muskulatur exprimierten Isoform bestehen zurzeit noch Unklarheiten (Shoeb et al., 2003; Shoeb et al., 2004).

Im Zentralnervensystem scheinen die erg-Kanäle an der K^+ -Homöostase beteiligt zu sein (Emmi et al., 2000). Außerdem gibt es Hinweise, dass die Expression von erg-Kanälen mit dem Zellzyklus assoziiert ist (Arcangeli et al., 1995; Crociani et al., 2003; Pillozzi et al., 2002). Trotz ihrer weiten Verbreitung im ZNS ist unklar, welche Rolle erg-Kanäle bezüglich der neuronalen Erregbarkeit explizit einnehmen (Saganich et al., 2001).

Eine hohe Anzahl der erg-Kanäle wurde bereits in mehreren Regionen des Säugerhirns nachgewiesen, in dessen verschiedenen Regionen sie sich teilweise überlappen (Saganich et al., 2001). Alle drei Untereinheiten sind im Bulbus olfactorius exprimiert (Guasti et al., 2005; Papa et al., 2003; Saganich et al., 2001). Diese konnten bereits intensiv mit erg1a-, erg1b-, erg2- und erg3-Antikörper gefärbt werden (Guasti et al., 2005). Hier haben erg1 und erg3 ähnliche Verteilungsmuster, angeordnet in den meisten Neuronen der Mitralzellen und der Körnerzellschicht, sowie auch ein verstreutes Auftreten in der Periglomerulärschicht (Saganich et al., 2001). Erg2 wurde ausschließlich in der Periglomerulärschicht und in den Mitralzellen des Bulbus olfactorius beobachtet (Saganich et al., 2001).

Zusätzlich konnten erg1- und erg3-Transkripte in den Retikularneuronen des Thalamus, im Cerebralcortex (mit unterschiedlicher Expression in jeder Schicht I-IV), im Cerebellum (hier war erg1 besonders in der Körnerzellschicht und in den Purkinjezellen ausgeprägt), im Hippocampus und auch in einigen Hirnstammkernen (Saganich et al., 2001) nachgewiesen werden.

2.2 Bulbus olfactorius

Der Bulbus olfactorius ist ein vorgestülpter Gehirnabschnitt, der direkt unterhalb des Frontalhirns liegt (s. **Abb. 2**) und der Geruchswahrnehmung dient (Breer et al., 2006). Histogenetisch gesehen ist er eine Ausziehung der Großhirnrinde, jedoch ohne kortikalen Charakter, da seine Zellzahl deutlich kleiner ist als die der übrigen Hirnrinde.

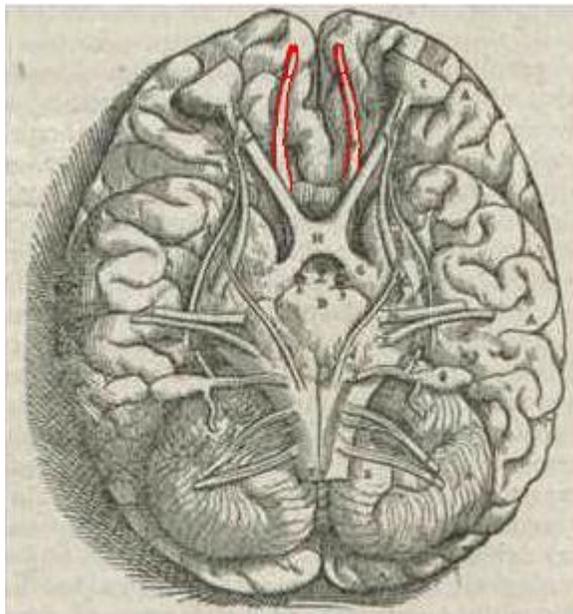


Abb. 2: Die beiden Bulbi olfactorii sind rot dargestellt, Quelle: Vesalius, 1543.

Beide Bulbi olfactorii sind in Glomeruli aufgeteilt. Es handelt sich um Regionen hoher Synapsendichte, in denen Neuriten primärer Sinneszellen enden. Signale von Zellen mit dem gleichen Geruchsrezeptor werden jeweils in einem Glomerulus (s. **Abb. 3**) im Riechkolben gebündelt (Axel & Buck 1991). Deren Axone bilden Synapsen mit den nachgeschalteten Mitralzellen. Jede Mitralzelle trägt daher nur Informationen die von einem Rezeptortyp stammen. Die inhibierend wirkenden periglomerulären Zellen und die Körnerzellen stellen laterale Verbindungen zwischen den Glomeruli und den Mitralzellen her und tragen daher zur Kontrastverschärfung des Geruchssinnes bei. Körnerzellen

bilden keine Axone und sind regenerationsfähig (für den histologischen Aufbau des Bulbus olfactorius, vgl. **Abb. 3**). Außer den Mitralzellen gibt es eine weitere Sorte sekundärer olfaktorischer Neuronen, die Tufted-Zellen. Diese koordinieren die glomeruläre Aktivität und teilen sich die meisten Eigenschaften mit Mitralzellen (Hayar et al., 2001). Dementsprechend können Mitral- und Tufted-Zellen in Kultur nicht unterschieden werden; und darum werden sie in diesem Fall kollektiv als M/T-Zellen bezeichnet.

Geruchssignale werden räumlich geordnet, in dem etwa 1000 Riechzellaxone auf eine Mitralzelle konvergieren. Die Mitralzellen, die in dieser Arbeit auf erg-Kanaluntereinheiten untersucht werden sollen, leiten die Signale über Axone weiter zum Riechhirn als Tractus olfactorius.

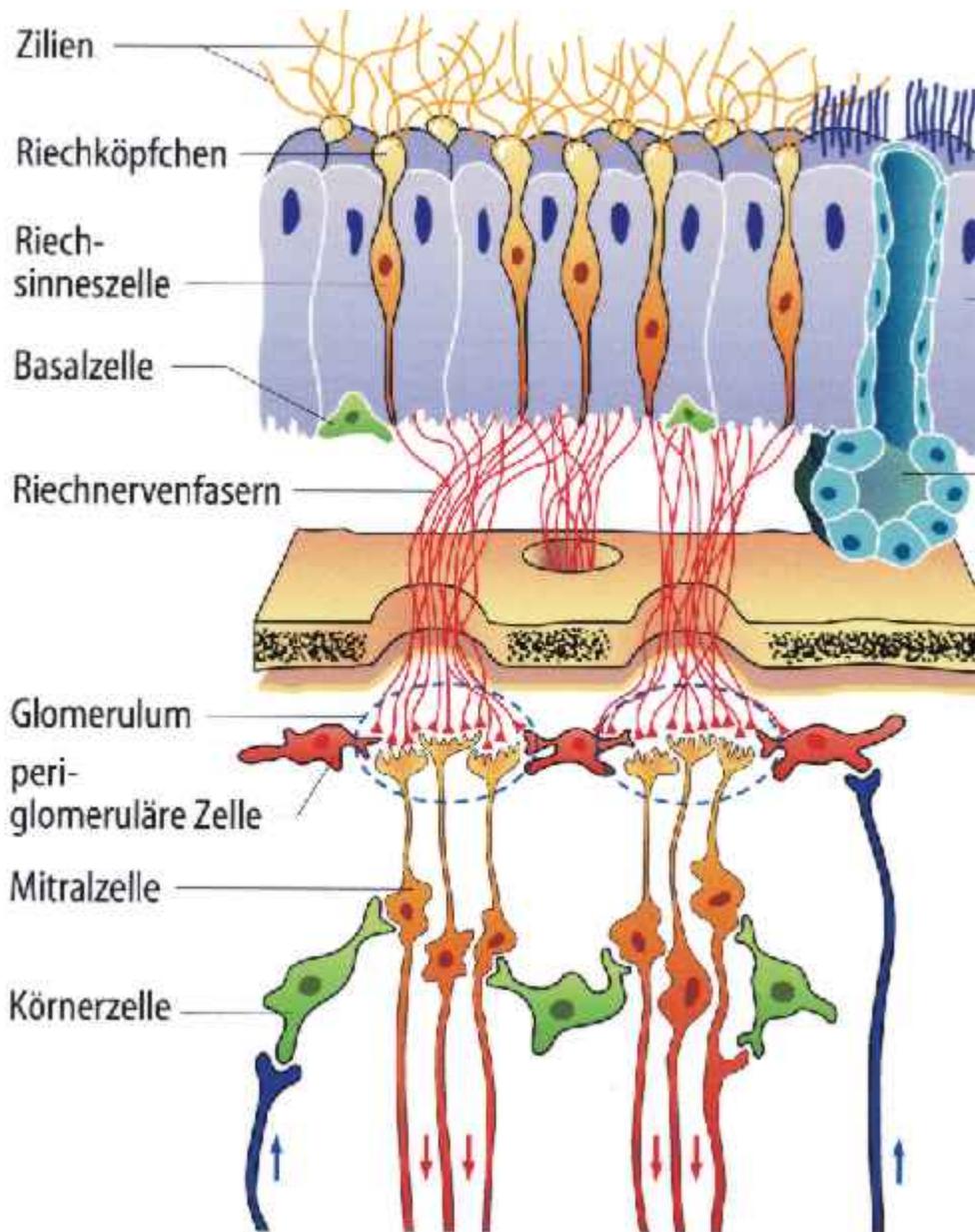


Abb. 3: Histologischer Aufbau des Bulbus olfactorius,
 Quelle: Schmidt, Thews (1997), Physiologie des Menschen: Springer Verlag, Berlin.

Metabotrope Glutamatrezeptoren vom Subtyp 1 (mGluR1)

Metabotrope Glutamatrezeptoren bilden eine neuartige Familie der Klasse C der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, bestehend aus acht bekannten Subtypen (Swanson et al., 2005). Weiterhin sind sie in drei Gruppen eingeteilt (Nakanishi 1992), deren Eigenschaften wiederum auf Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz, in der Pharmakologie und insbesondere in Signaltransduktionsmechanismen basieren. Der Subtyp mGluR1 gehört zusammen mit dem Subtyp mGluR5 zur Gruppe I der metabotropen Glutamatrezeptoren. Diese beiden Subtypen haben die Eigenschaft an Phospholipase C zu koppeln und Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern zu mobilisieren.

mGluR1 ist im ZNS exprimiert, am stärksten in den Mitralzellen des Bulbus olfactorius und in den Purkinje Zellen des Cortex cerebelli (Martin et al., 1992; Shigemoto et al., 1992; Baude et al., 1993). In dieser Arbeit sollen deshalb Antikörper gegen mGluR1 verwendet werden, um sie immunzytochemisch zu färben. Somit können Mitralzellen im Gewebe des Bulbus olfactorius identifiziert werden. In situ Hybridisierungsexperimente haben gezeigt, dass in Schaltkreisen des olfactorischen Systems beteiligte Neurone in fast allen Gehirnstrukturen eine relativ hohe Dichte von mGluR1 exprimieren (Shigemoto et al., 1992).

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur (Institut für Angewandte Physiologie)

In der Zellkultur sollte immer so steril wie möglich gearbeitet werden. Alle verwendeten Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre gehalten.

Für die Transfektionsexperimente sowie auch für die immunzytochemischen Färbungen wurde eine kleine Menge Zellsuspension in jede Kammer auf Poly-D-Lysin beschichtete Objektträger mit 8-kammerigem Aufsatz (BD FalconTM) gegeben. Nach drei Minuten hatten sich die Zellen abgesetzt, so dass Nährmedium zugegeben werden konnte. Die Objektträger wurden in große Zellkulturschalen (Nunc) gestellt und dann ein bis zwei Tage bis zum Versuch im Brutschrank gelagert.

3.1.1 CHO-Zellkultur

Nährmedium

89,5 % MEM alpha Medium (Gibco BRL)

10% fetales Kälberserum (Biother GmbH)

0,3% L-Glutamin (Sigma)

100 U/ml Penicillin (Sigma)

100µg/ml Streptomycin (Sigma)

Die CHO-Zelllinie entstammt Ovarialtumoren chinesischer Hamster. CHO-Zellen besitzen funktionell nur sehr wenige endogene Ionenkanäle (Puck et al., 1958) und sind deshalb besonders gut geeignet, überexprimierte Kanäle isoliert darzustellen.

Kultivierung

CHO Zellen wachsen nestförmig und zudem sehr schnell. Deshalb werden sie drei Mal pro Woche passagiert. Dabei wird das alte Medium abgesaugt und Trypsin-EDTA zugegeben, um die Zellen vom Flaschenboden lösen zu können. Die enzymatische Wirkung der Trypsin-EDTA-Lösung wurde durch Zugabe von Nährmedium nach dreiminütiger Inkubation gestoppt. Die Zellen wurden dann mit einer Pasteurpipette kräftig aufgewirbelt und vereinzelt. Es wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob die Zellen auch gut gelöst und vereinzelt waren. Die Zellsuspension wurde in zwei neue Zellkulturflaschen gegeben, pro Flasche 3-6 Tropfen, je nach Dichte. Die neu angesetzten Zellkulturflaschen wurden dann bis zu jeweils 10ml mit steril filtriertem Nährmedium aufgefüllt.

3.1.2 HEK-293 Zellkultur

Nährmedium

90% Dulbecco´s modified eagle medium, DMEM (GibcoBRL)

10% fetales Kälberserum (Biother GmbH)

5% PSG (Sigma)

HEK steht für *human embryonic kidney*, also sind HEK-Zellen menschliche embryonale Nierenzellen. Diese Zellen wachsen netzförmig adhärend und sind fibroblastenähnlich. Wie die CHO Zellen haben HEK Zellen von Natur aus nur wenige spannungsabhängige Kaliumkanäle.

Kultivierung

Die Zelldichte der HEK-Zellen verdoppelt sich alle 1-1,5 Tage und daher werden sie zwei Mal pro Woche gesplittet. Nach dem Absaugen des alten Nährmediums, wie bei den CHO-Zellen, wurden die Zellen zunächst mit PBS (Phosphatpuffer, phosphate-buffered saline) gewaschen. Die Inkubation mit Trypsin-EDTA erfolgte 30 Sekunden lang. Anschließend erfolgte die Aufwirbelung und die mikroskopische Kontrolle der Zellen.

Die entsprechende Menge wurde aus der Zellsuspension in zwei neue Flaschen auf 10ml Nährmedium aufgefüllt.

3.2 Bulbus olfactorius Primärkultur (Zentrum für Molekulare Neurobiologie)

3.2.1 Lösungen und Medien

- a) Earl's balanced salt solution (EBSS) (Gibco-Invitrogen)
- b) Enzymlösung
 - 0,5 Einheiten Papain pro ml EBSS (Worthington Biochemical)
 - 0,2 mM L-Cystein (Sigma)
 - 0,1 mM EDTA (Sigma)
- c) Trypsininhibitorlösung, 0,5 %ig (Sigma)
- d) Plating-Medium (Gibco- Invitrogen)
 - 10% Pferdeserum (Gibco- Invitrogen)
 - 0,06% Glucoselösung
- e) Neuronenmedium: MEM mit Zusatz von
 - 0,1% Ovalbumin (Sigma)
 - 5 µg/ml Insulin (Sigma)
 - 1 mM Pyruvat (Sigma)
 - 0,1 mM Putrescin (Sigma)
 - 0,02 µg Progesteron (Sigma)
 - 0,03 µg Selenium (Sigma)
 - 100 µg/ml Transferrin (Sigma)
 - 6% Glucose (Sigma)
- f) Ara-C haltiges Medium (Sigma)

3.2.2 Kultivierung und Präparation

Die Kultivierung und Präparation wurde im ZMNH (Zentrum für Molekulare Neurobiologie) unter Anleitung von Dr. M. Schweizer durchgeführt. Tierversuche mit Mäusen entsprachen den Richtlinien der Tierschutzkommission des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Neugeborene Mäuse wurden mit CO₂ narkotisiert und anschließend dekapitiert. Dann wurde die Kopfhaut längsgespalten und die Schädelkalotte mit dem oberen Ende einer Pinzette abgehelt.

Nach dem Freipräparieren des Gehirns wurden die Bulbi olfactorii in frischer EBSS (Earl's balanced salt solution) gespült. Danach wurden sie bei 37°C in der Enzymlösung (s.o.) 20 Minuten lang inkubiert. Die Enzymwirkung wurde durch die Zugabe von 1 ml Trypsininhibitorlösung nach 5-minütiger Inkubation gestoppt.

Nach Reaktionsstopp wurde eine Trituration der Zellverbände in Plating-Medium durchgeführt. Kleine Mengen von Zellsuspension wurden dann auf Deckgläschen (Nunc) mit einer Zelldichte von 150 000 pro Deckgläschen plattiert, welche mit Poly-D-Lysin (Sigma) und Laminin (Sigma) beschichtet waren. Die Deckgläschen wurden dann in 24-Well Platten mit dem Plating-Medium (Gibco-Invitrogen) gelegt. Drei Stunden später wurde die Hälfte des Plating Mediums durch normales Neuronenmedium ersetzt.

Nach einer Woche wurde das Neuronenmedium abgesaugt und durch 5µM Ara-C haltiges Medium ersetzt. Das Ara-C haltige Medium wurde ca. einmal pro Woche erneuert. Um elektrophysiologische Messungen und die darauffolgenden Färbungen durchführen zu können, mussten die Primärkulturen mindestens 10 Tage alt sein.

3.3 Transfektion

3.3.1 Plasmide/Klone

Zur heterologen Expression der erg-Kanaluntereinheiten wurden CHO- und HEK-Zellen mit pcDNA3.1 Vektoren (Invitrogen) transfiziert, in denen sich einklonierte cDNA befand, welche für die einzelnen Ratten-analog erg-Kanaluntereinheiten *reg1*, *reg2* und *reg3* kodiert. Bei einigen dieser Plasmide war die cDNA an ein Fluoreszenzprotein, EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) gekoppelt, welches bei seiner Expression entsprechend grün fluoreszierte. Diese speziellen Plasmide werden von nun an entweder als *tagged* bezeichnet, oder sonst als *untagged*, wenn sie nicht an EGFP gekoppelt sind (s. Ergebnisse).

Folgende Plasmide wurden verwendet:

<u>Plasmid</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Hersteller</u>
pcDNA3.1/ <i>reg1</i> /EGFP	EGFP- <i>tagged</i> cDNA für <i>reg1</i> kodierend	Eigenherstellung
pcDNA3.1/ <i>reg2</i> /EGFP	EGFP- <i>tagged</i> cDNA für <i>reg2</i> kodierend	Eigenherstellung
pcDNA3.1/ <i>reg3</i> /EGFP	EGFP- <i>tagged</i> cDNA für <i>reg3</i> kodierend	Eigenherstellung
pcDNA3.1/EGFP	cDNA für EGFP kodierend	Clontech
pcDNA3.1/ <i>reg1</i>	cDNA für <i>reg1</i> kodierend	Bauer et al., 1998
pcDNA3.1/ <i>reg2</i>	cDNA für <i>reg2</i> kodierend	Shi et al., 1997
pcDNA3.1/ <i>reg3</i>	cDNA für <i>reg3</i> kodierend	Shi et al., 1997

Tabelle 1: Plasmide verwendet für die Transfektion von Zellen.

3.3.2 Lösungen und Medien

- a) Opti-MEM (Eigenherstellung)
- b) Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
- c) 4% Formalin

11,4 ml 35% Formalin (Merck)

88,6 ml Phosphate-buffered saline (PBS) (s.u.)

3.3.3 Methode

Transfiziert wurden CHO- und HEK-Zellen, die ein bis zwei Tage zuvor auf Poly-D-Lysin beschichteten Objektträgern (BD Falcon™) mit 8-kammerigem Aufsatz ausplattiert worden waren und bis zu Beginn des Experiments im Brutschrank inkubiert wurden. Nach folgendem Schema wurde dann pipettiert:

1	2	3	4
5	6	7	8

Tabelle 2: Pipettierschema für die Transfektion von Zellen

Es wurden für die Felder 1-8 zwei Ansätze **A** und **B** in 2ml Gefäße (Eppendorf) wie folgt angesetzt:

A 416µl Opti-MEM + 12µl Plasmid/Klon (Konzentration: 1µg/ml)

B 416µl Opti-MEM + 8µl Lipofectamine 2000

Die Ansätze wurden fünf Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann zusammengemischt. Danach wurde die Mischung **A+B** 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Anschließend wurden je 50µl A+B in die entsprechenden Kammern des Objektträgers pipettiert und vorsichtig mit der Pipette kurz gemischt. Dann wurden die Zellen erneut bei 37°C und 5% CO₂ für mindestens 24 Stunden inkubiert.

Die Zellen wurden danach mit Formalin wie folgt fixiert: Dabei wurde zuerst das Nährmedium abgesaugt. Dann wurde in jede Kammer des Objektträgers 500µl PBS pipettiert und 5 Minuten auf einen Kreisschüttler gestellt (VXR basic IKA-Vibrax®), bei ca. 100 Umdrehungen pro Minute (UpM). Das PBS wurde wiederum abgesaugt und der Vorgang wurde erneut wiederholt. Dann wurde in jede Kammer 500µl 4% iges Formalin pipettiert. Der Objektträger wurde nun 5-10 Minuten auf dem Kreisschüttler (VXR basic IKA-Vibrax®) bei ungefähr 100 UpM belassen. Danach wurde der oben beschriebene Waschvorgang mit PBS noch 2-3 Mal durchgeführt.

CAVE! Flüssigkeiten sollten stets vorsichtig von den Zellen abgesaugt werden, um die Zellen nicht aus Versehen abzusaugen. Bei Formalin darf nach dem Absaugen kein Flüssigkeitsfilm auf den Zellen verbleiben, da die zu lange Einwirkzeit von Formalin auf die Zellen eine denaturierende Wirkung hat. Pipettiert werden sollte auch mit äußerster Vorsicht, da die Zellen auf dem Objektträger aufgewirbelt werden könnten. Deshalb darf nur langsam an den Rand hin pipettiert werden.

Die fixierten Zellen wurden anschließend bei 6,4°C bis zur Immunzytochemie im Kühlraum gelagert.

3.4 Immunzytochemie

Gefärbt wurden transfizierte CHO- und HEK-Zellen, (heterologe Expressionssysteme) und die in 3.2 beschriebenen Mitralzellen (Bulbus olfactorius) aus dem Zentrum für Molekulare Neurobiologie stammend, auf Poly-D-Lysin beschichteten CELLocates® (Glassplättchen mit Rasterung, Eppendorf).

Dazu wurden diverse Antikörper (s. Tabelle unten) eingesetzt. Außerdem wurden auch Kreuzreaktionen zwischen den folgend genannten Antikörpern und den verschiedenen erg-Kanälen untersucht, d.h. manche Antikörper wurden auf mehr als nur eine erg-Kanaluntereinheit getestet (s. Ergebnisse).

3.4.1 Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>	<u>gerichtet gegen (Kanal)</u>
APC016	Alomone Labs	erg1
APC062	Alomone Labs	erg1
H175	Santa Cruz	erg1
CR1	Eigenproduktion	erg2
CR2	Eigenproduktion	erg2
erg2	Alomone Labs	erg2
TB1	Eigenproduktion	erg3
TB2	Eigenproduktion	erg3

Tabelle 3: Liste der Antikörper für die immunzytochemischen Färbungen.

3.4.1.1 Primärantikörper

Anti- Ratte

- Polyklonaler **Anti-K_v 11.1 (erg1)** Antikörper, #**APC016** (Alomone Labs)
- Konzentration 2mg/ml
- aus Kaninchen
- wurde getestet für Western blotting an HEK 293 Zellen und Immunhistochemie
- inkubiert mit Verdünnungen von 1:100, 1:200, 1:400, 1:1 000
- getestet gegen erg1 (Nachweis)

Anti-Human

- Polyklonaler **Anti-hK_v 11.1 (HERG)** Antikörper, #**APC062** (Alomone Labs)
- Konzentration 2mg/ml
- aus Kaninchen
- wurde getestet für Western blotting an HEK 293 Zellen, Immunzytochemie und Immunprecipitation
- inkubiert mit Verdünnungen von 1:200, 1:400, 1:1 000
- getestet gegen erg1 (Nachweis)

- Polyklonaler **Anti-K_v 11.2 (erg2)** Antikörper, #**APC114** (Alomone Labs)
- Konzentration 2 mg/ml
- aus Kaninchen
- wurde getestet für Western blotting und Immunhistochemie
- inkubiert mit Verdünnungen von 1:500, 1:1 000, 1:5 000, 1:10 000
- getestet gegen erg2 (Nachweis)

- Polyklonaler **Anti-HERG (H175) IgG Antikörper**, **sc-20130** (Santa Cruz Biotechnology)
- Konzentration 0,2 mg/ml
- aus Kaninchen
- wurde getestet für Western blotting
- inkubiert mit Verdünnungen von 1:100, 1:200, 1:400
- getestet gegen erg1 (Nachweis)

Polyklonale Antikörper aus eigener Produktion

Primäre Antikörper gegen erg2- und erg3 Kanal-Untereinheiten wurden im Labor des Instituts für Angewandte Physiologie unter Anleitung von Dr. Iris Wulfsen hergestellt. Die Antikörpernamen CR1, CR2, TB1 und TB2 sind die gleichen wie die interne Bezeichnung der Wirte, nach denen sie benannt wurden (in diesem Fall Kaninchen).

Fusionsproteine aus den Antigenen waren die erg-Kanaluntereinheiten und die Glutathion-S-Transferase.

Die Kaninchen CR1 und CR2 wurden genau wie die Kaninchen TB1 und TB2 mit der gleichen Antigenmischung immunisiert. Jedoch reagierten beide Individuen jeweils unterschiedlich auf einzelne Epitope der erg-Fusionsproteine und bildeten demzufolge keine identischen Antikörper. Das gleiche gilt für TB1 und TB2.

Die Immunantwort der Kaninchen wurde durch ein geeignetes Testverfahren geprüft, in diesem Fall durch die Immunreaktion der gebildeten Antikörper auf Western Blots, hergestellt im Institut für Pharmakologie/Institut für Angewandte Physiologie.

Gegen das rekombinante Fusionsprotein des erg2 zeigte CR1 die beste Immunantwort, und gegen das Fusionprotein des erg3 zeigte TB2 die beste Immunantwort. Nachdem die Ergebnisse der Immunreaktionen der Antikörper sich als zufrieden stellend zeigten, wurde das gesamte Blut der geimpften Kaninchen CR1, CR2, TB1 und TB2 abgenommen (*final bleeding*). Das Serum wurde dann aufgereinigt und anhand von einem Dialyseverfahren aufkonzentriert, um die gewünschten Antikörper zu erhalten. Spätere Resultate von den hergestellten Antikörpern auf Western Blots sind in **Abb. 4** dargestellt.

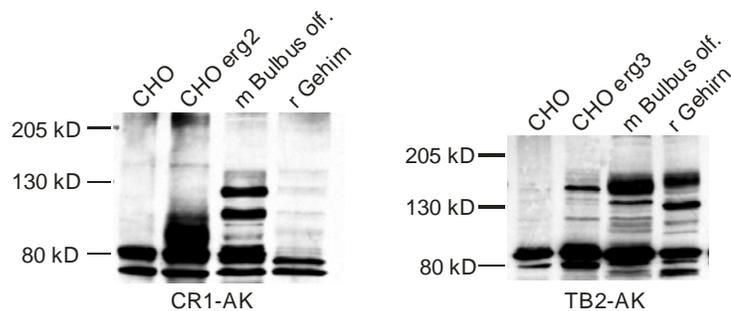


Abb. 4: Western Blots zeigen die Immunantwort der Kaninchen CR1 und TB2 auf die rekombinanten GST – Fusionsproteine der erg2 Kanäle (links) und der erg3 Kanäle (rechts). Die Molekularmasse der erg2- und erg3-kanäle entsprechen 106kD bzw. 135kD.

Die Aminosäuresequenzen der einzelnen erg-Kanaluntereinheiten zeigt **Abb. 5**. Die erg2-Sequenz ist zu 63% identisch mit der Aminosäuresequenz der erg1-Untereinheit und die erg3-Sequenz zu 57%. Sequenzen der erg2-Untereinheit, verglichen mit denen der erg3-Untereinheit, zeigen zu 63% identische Gleichheit (Shi et al., 1997). Gezeigt sind drei konservierte Domänen: der anfängliche N-Terminus, die hydrophobe Innenregion und die putative, zyklische, nukleotidbindende Domäne (Shi et al., 1997). Jedoch zeigt sich keine Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen an den C-Termini. Hier befinden sich die einzelnen Antigene, die mit den getesteten Antikörpern reagieren.

Sequence alignment of the three rat erg channel subunits

reg1 reg2 reg3	MPVRRGHVAPQNTFLDTIIRKFEQSRKFI IANARVENCAVIYCNDFCELCGYSRAEVMQRPCTCDFLHGPRTRRAAAQIAQA MPVRRGHVAPQNTYLDTIIRKFEQSRKFLIANAQMENCAIYCNDFCELCGYSRVEVMQRPCTCDFLTGPNTSPASSVRLAQA MPVRRGHVAPQNTFLGTIIRKFEQGNKFI IANARVQNCALYICNDFCEMTEGFSRFPDVMQKPCDFLHGPETRKRDIAQIAQA	85 85 85
	LLGAEERKVEIAFYRKDGCFLCLVDVVPVKNEGDGAVIMFIIINFEVVMKDMVGS PAHDTNHRGPSTSWLASGRAKTFRLKLPAL LLGAECEKVDILYRKDASSFRCLVDVVPVKNEGDGAVIMFIIINFEVVMKDMVGS PAHDTNHRGPSTSWLASGRAKTFRLKLPAL LLGSEERKVEVYTHKNGSTFICNTHIIPVKNQEGVAMMFIINFEVVTDEDNAASP-----ERVNPIIPVKSVMRKLFGKFPGL	170 153 165
	LALTARESPMRTGTGSPGAPGAVVVDLTPAAPSSSESLALDEVSAMDNHVAGLGAEEERRALVGPASASPVASIPGPH----P LGSEGSHS---R-----P-----S-----GQGP-----P RVLTYRKQLPQED-----PDVVVID-S---SKHSDSVAMKHFKSPTEKESCPSEADDTKALIQPSQCSPLVNI SGPLDHSSP	251 170 240
	SPRAQSLNPDASGSSCLARTSRESCASVRRASSADDIEAMRAGAL-PLPPRHAS-----TGAMHPLRSGLLNSTSDSLVR G-----RGK----- KRQWDRLYPDMQLSSQLTHSRRESLCSIRRASSVHDIEGFVNVHFKNI FRDRHASEDNGRNVKGFPHIKSSLLGSTSDSNLTK	328 174 325
	YRTISKIPQITLNFVDLKGDPFLASP-TSDREIIAP-KIKERTHNVTEKVTQVLSLGADVLPEYKLAQAPRIHRWTILHYSPPKAV YRTVSIQIPQFTLNVEFNLEKHRSGS-TTEIEIIAPHKVVERTQNVTEKVTQVLSLGADVLPEYKLAQAPRIHRGTILHYSPPKAV YSTINKIPQLTLNFDVVKTEKNTSPSSDKTI IAP-KVKERTHNVTEKVTQVLSLGADVLPEYKLAQAPRIHRGTILHYSPPKAV	411 258 409
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-bottom: 5px;"> S1 S2 </div> WDWLILLVITYAVFTPYSAAFLLKETEDGSGAPDCGYACQPLAVVLLVDIMFIVDILINFRITTYVNAEEVVSHPGRIAVHYF WDWLILLVITYAVFTPYSAAFLLSDQ-DESQRGTGCGYCSPLTVVDLIVDIFVVDIVINFRITTYVNTNDEVVSHPRRIAVHYF WDWLILLVITYAIFTPYSAAFLLNDR-EEQKRREGCYSCSPLNVVDLIVDIFVIDILINFRITTYVNVQNEEVVSDPAKIAVHYF	496 342 493
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-bottom: 5px;"> S3 S4 S5 </div> KGWFLIDMVAIIPFDLLIFGSGSEE---LIGLLKTARLLRLVVRARKLDRYSEYGAAVLFLMCTFALIAHMLACIWIYAIGNMEQ KGWFLIDMVAIIPFDLLIFRTGSDETTTLIGLLKTARLLRLVVRARKLDRYSEYGAAVLFLMCTFALIAHMLACIWIYAIGNVER KGWFLIDMVAIIPFDLLIFGSGSDETTT LIGLLKTARLLRLVVRARKLDRYSEYGAAVLMLLMCIFALIAHMLACIWIYAIGNVER	578 427 578
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-bottom: 5px;"> P S6 </div> PHMDSHIGWLHNLGDQIGKPYNS-GLGGPSIKDKYVTALYFTFSSLSVGFQNVSPNTNSEKIFPSICVMLIGSLMYASIFGNVS PYLEPKIGWLDLSLGAQLGKQYNGSDPASGSPVQDKYVTALYFTFSSLSVGFQNVSPNTNSEKIFPSICVMLIGSLMYASIFGNVS PYLTDKIGWLDLSLGTQIGKRYNDSSSSGPSIKDKYVTALYFTFSSLSVGFQNVSPNTNSEKIFPSICVMLIGSLMYASIFGNVS	662 512 663
	AIIQRLYSGTARYHTQMLRVREFIRFHQIPNPLRQRLEEFQHAWSYTNIGIDMNAVILKGFPECLQADICLHLNRSLLQHCQKPFRRG AIIQRLYSGTARYHTQMLRVKEFIRFHQIPNPLRQRLEEFQHAWSYTNIGIDMNAVILKGFPECLQADICLHLNRSLLQHCQKPAFRG AIIQRLYSGTARYHMQLRVKEFIRFHQIPNPLRQRLEEFQHAWSYTNIGIDMNAVILKGFPECLQADICLHLNRSLLQHCQKPAFRG	747 597 748
	<div style="text-align: center; margin-bottom: 5px;"> cNBD </div> ATKGCLRALAMKFKTT HAPPGDTLVHAGDLLTALYFISRGSIEILRGDVVVAIILGKNDIFGEPALNLYARPGKSNADVRALTYCDL ASKGCCLRALAVKFKTT HAPPGDTLVHAGDVLSTLYFISRGSIEILRDDVVVAIILGKNDIFGEPALNLYARPGKSNADVRALTYCDL ASKGCCLRALAMKFKTT HAPPGDTLVHCGDVLTAFLYFISRGSIEILKDDIVVAIILGKNDIFGEMVHLYARPGKSNADVRALTYCDL	832 682 833
	HKIHRDDLLEVLDMYEPESDFHWSLEITFNLRDNTMIIPGSPSSAELESFNRQKRKLSFRRTDKDTEQPGVVSALGQGPAPRV HKIHRADLLEVLDMYPA--FADTFWNKLEVTFNLRDADGGLQSTPR-----QAPGHQDPQGFLLNDSQS-----GAAPSL HKIQREDLLEVLDMYEPESDFHFLTNLELTFNLRHESAKSQSINDSEGD--TCKLRRRLSFESEGDKDFSKEN-----SANDADD	917 751 911
	GPGPSCRQPGGPGWGESPSGSPSSPESEDE--GPRSSSPLRLVFPSSPRPPGDS PGGEPLTEDEGEKSSDTCNPLSGAFSGVSN -----ISDTSALNPELLQCMPPSP-----P-----NPRQDLDCWHRELGEKLEQLQAQMNRLSRSVSDLSR STDTIRRYQSSKHFEEKRSRSSFISSIDDEQKP-----LFLGTVDSTPRMVKASRHHGEAAAPPGR IHTDKRSHSCKDIT	1000 808 989
	IFSFWGDSRGRQYQELPRCPAPAPSLNIPSSPGRRSRQDVESRLDALQRLNRLRLETRLSADMATVLQQLQRQMTLVPPAYS AV ILQLLQRHQR--PSYILGASASSDLASFPFETSVTRSS---ES----TLVGHVPSAQTLVSYGDLDDHIQTFRNFPSP----- DTHSWEREHARAQPEECPSPGLQRAAWGISETESDLYG-EVEQRLDLLQEQLNRLSQTMTDIIQAILQLLQKQTTVPPAYS MV	1085 876 1073
	-----TTPGPGPTSTSPLLVPG-----PVPTLTLDLSLQVVSQ-----FVAPEELPAGAPELPQ-- -----RTPHVAMAMDKTLVPS-----SEQEQPGG-----LLSPLASPLRPLEVFG-- TAGAEYQRPILRLRSHPRASIKTRSFSPSSQCFELDLEKSKLKSKESSGKRLNTASEDNLTSLKQDSDASSELDPRQR	1133 916 1158
	---DGPTRRLSLPGQLGALTSQ-PLHRHGSDPGS--- ---LGGSRFPLPERLSSVPPQLEFQRHGSDFGTR KSYLHPHPSLPDSSSLTVGILGLHRHVSDFGLPGK	1163 950 1195

Abb. 5: Aminosäuresequenzen erg1, erg2 und erg3 Kaliumkanaluntereinheiten. *S1-S6*, in grau hinterlegt, zeigen die Sequenzen der einzelnen sechs Transmembrandomänen, aus denen die eag-Kanaluntereinheiten bestehen und *P*, ebenfalls in grau hinterlegt, die Aminosäuresequenz der Porenregion der eag-Kanaluntereinheiten. *cNBD*, in gelb schattiert stellen die Aminosäuresequenz der putativen Bindungsstelle für zyklische Nucleotide dar. Vgl. auch **Abb. 1**. Die verwendeten Fusionsproteinanteile der erg2-Kanaluntereinheiten liegen im Bereich der Aminosäuren 722-950 (in grün dargestellt), und die der erg3-Kanaluntereinheiten im Bereich 976-1090 (in lila).

Eingesetzte Konzentrationen der Antikörper aus Eigenherstellung

CR1 Antikörper

- inkubiert mit Verdünnungen von 1:2 000, 1:5 000, 1:10 000, 1:15 000, 1:20 000
- eingesetzt gegen erg2

CR2 Antikörper

- inkubiert mit Verdünnungen von 1:1 000, 1:2 000, 1:5 000, 1:10 000
- eingesetzt gegen erg2

TB1 Antikörper

- inkubiert mit Verdünnungen von 1:2 000, 1:5 000, 1:10 000, 1:15 000, 1:20 000
- eingesetzt gegen erg3

TB2 Antikörper

- inkubiert mit Verdünnungen von 1:2 000, 1:5 000, 1:10 000
- eingesetzt gegen erg3

Antikörper gegen metabotrope Glutamatrezeptoren vom Subtyp 1 (mGluR1)

Polyklonale mGluR1-Antikörper (Novus Biologicals) wurden verwendet, um die metabotropen Glutamatrezeptoren in den Mitralzellen im Bulbus olfactorius zu identifizieren, die sich dort in einer hohen Dichte befinden.

Die Antikörper waren:

- aus Mäusen
- getestet für Western blotting
- inkubiert mit Verdünnungen von 1:1 000
- getestet gegen mGluR1 Rezeptoren in Primärkulturzellen des Bulbus olfactorius

3.4.1.2 Sekundärantikörper

Anti- Kaninchen

- Polyklonaler **Alexa Fluor® 488 Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper, A-11008** (Invitrogen), grün fluoreszierend
- Konzentration 2mg/ml
- wurde getestet für Immunhistochemie
- inkubiert mit einer Verdünnung von 1:2 000

- Polyklonaler **Alexa Fluor® 546 Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper, A-11010** (Molecular Probes), rot fluoreszierend
- Konzentration 2mg/ml
- wurde getestet für Immunhistochemie
- inkubiert mit einer Verdünnung von 1:4 000 und 1:6 000

Anti-Maus

- **Alexa Fluor® 546 Ziege anti-Maus IgG Antikörper, A-11003** (Molecular Probes), rot fluoreszierend
- Konzentration 2 mg/ml

- wurde getestet für Immunhistochemie der Bulbus olfactorius-Zellen
- verwendet für die Immunzytochemie der Bulbus olfactorius-Zellen in dieser Arbeit
- eingesetzt mit einer Konzentration von 1:6 000

3.4.2 Lösungen und Medien

a) Phosphatpuffer, PBS

- 2,68 mM Kaliumchlorid (Merck)
- 1,47 mM Kaliumhydrogenphosphat (Merck)
- 1,37 mM Natriumchlorid (Merck)
- 8 mM di-Natriumhydrogenphosphat (Merck)

b) Blockadeserum

- 10% Ziegennormalserum
- 0,2% BSA
- PBS

c) Carrier

- 1% Ziegennormalserum
- 0,2%, bzw. 1%, BSA
- PBS

d) Triton

- in PBS gelöst, 1%, 2%, 3%

e) Fluoromount-GTM (Southern Biotech) zur Eindeckelung

3.4.3 Methode

3.4.3.1 Heterologe Expressionssysteme

Zuerst wurden die Lösungen Blockadeserum und Carrier mit dem Detergenz Triton versetzt. Sowohl das Blockadeserum als auch der Carrier enthalten BSA, welches der Absättigung von unerwünschten, unspezifischen Proteinbindungen diene. In diesem Fall reduziert es unspezifische Bindungen der Antikörper (Hintergrundfärbung). Triton besitzt detergente Eigenschaften. Es kann Oberflächenproteine aus den Zellen herauslösen und erhöht auf diese Weise die Permeabilität der Zellmembranen. Je nach Versuch wurde entweder 1%-, 2%- oder 3% iges Triton in PBS gelöst, so dass die Endkonzentration des Tritons im Blockadeserum oder in der Carrierlösung 0,1%, 0,2% oder 0,3% entsprach. Die Carrierlösung enthielt in den heterologen Expressionssystemen in jedem Versuch 0,2% BSA. In den immunzytochemischen Färbungen der Bulbus olfactorius-Präparate wurden die Carrierlösungen teilweise mit 1%igem BSA versetzt. Anschließend, nach vorsichtigem Absaugen des PBS, wurden 500µl des Triton enthaltendem Blockadeserums in jede Kammer pipettiert, welches danach auf dem Kreisschüttler (VXR basic IKA-Vibrax®) bei ungefähr 100 UpM für 30 Minuten inkubiert wurde. Währenddessen wurden die verschiedenen Konzentrationen der primären Antikörper angesetzt.

Nach 30 Minuten wurde das Triton enthaltende Blockadeserum abgesaugt und die primären Antikörper verschiedener Konzentrationen in Triton enthaltender Carrierlösung in die Kammern des Objektträgers zugegeben (s. Schema unten, **Tabelle 4**).

Kein AK (Kontrolle)	Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3
Kein AK (Kontrolle)	Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3

Tabelle 4: Pippetierschema für die Immunzytochemie heterologer Expressionssysteme. Die ausplattierten Zellen auf dem 8-kammerigen Objektträger wurden bereits transfiziert.

Die Objektträger wurden anschließend über Nacht in den Kühlraum auf einem Schüttler (Polymax 1040, Heidolph Instruments) belassen, der auf ca. 10 UpM eingestellt wurde.

Am nächsten Tag wurde, nach vorsichtigem Absaugen des Primärantikörpers, der sekundäre Antikörper in Carrierlösung in jede Kammer des Objektträgers in gleicher Konzentration zugegeben und anschließend 90 Minuten auf dem Kreisschüttler (VXR basic IKA-Vibrax®) bei ungefähr 100 UpM inkubiert.

CAVE! Sekundärantikörper sind lichtempfindlich! Deshalb muss das Gefäß, in dem er gelagert ist, sowie auch die Objektträger, während der Inkubation stets in Alufolie eingewickelt werden. Auch bei der Verdünnung sollte Vorsicht geboten sein.

Nach der Inkubation werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zur längerfristigen Lagerung werden die Objektträger eingedeckelt (s. u.).

3.4.3.2 Natives Gewebe

Nachdem diverse Primärantikörper gegen erg-Kanaluntereinheiten getestet und die am besten Geeigneten identifiziert wurden, fand die praktische Anwendung der immunzytochemischen Färbetechnik an Hand von Mitralzellen im Bulbus olfactorius mit den entsprechenden ausgewählten Antikörpern statt. Die Methode erfolgte analog zur Immunzytochemie der heterologen Expressionssysteme.

Die immunzytochemische Färbung wurde auf den Deckgläschen (Nunc) durchgeführt, jeweils in einer Vertiefung von 4-Well Multischalen (Nunc), auf denen sie ausplattiert waren (s. Schema unten, **Abb. 6**).

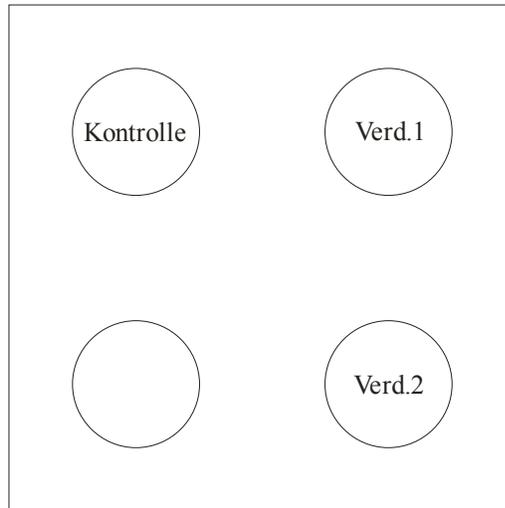


Abb. 6: Pipettierschema für die Immunzytochemie der Zellen des Bulbus olfactorius. Die linke, untere Kammer wurde in diesen Versuchen nicht belegt.

In jeder einzelnen Immunzytochemie wurden zusätzlich Negativkontrollen angefertigt. Sie wurden genau wie die Positivkontrollen durchgeführt, allerdings mit dem einzigen Unterschied, dass bei ihnen kein Primärantikörper zugegeben wurde. Keine der durchgeführten Negativkontrollen wurden vor der Zugabe des Sekundärantikörpers durch ein geeignetes Antigen blockiert, da uns keines zur Verfügung stand.

3.4.3.3 Eindeckeln

Das PBS in den Kammern eines jeweiligen Objektträgers wurde abgesaugt. Der Kammeraufsatz der Objektträger wurde dann vorsichtig entfernt. Mit einer Plastikpipette (Eppendorf) wurde Fluoromount-GTM (Southern Biotech) auf die Ränder des Objektträgers gegeben. Der Objektträger wurde mit einem Deckglas bedeckt (Marienfeld, 24x60 mm). Zum Trocknen wurde der Objektträger über Nacht in den Kühlraum gelegt. Am nächsten Tag wurden die Ränder mit 70% Ethanol (Mallickrodt Baker) gereinigt.

Für die Bulbuszellen wurden runde Deckgläser (Karl Hecht) zur Eindeckelung genommen, die auf die Bulbuszellen in die Wells der Multischalen (Nunc) mit Fluoromount-GTM (s.o.) platziert waren.

3.4.3.4 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der immunzytochemischen Färbungen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 (Zeiss). Folgende Filter wurden eingesetzt: **Filter set 00** (488000-0000, Zeiss), Anregung: 530 – 585 nm, Emission: 615nm, Zellen fluoreszierten nach entsprechender Anregung rot. **Filter set 10** (488010-0000, Zeiss), Anregung: 450 – 490 nm, Emission: 515 – 565 nm, Zellen fluoreszierten nach entsprechender Anregung grün. Mittels eines angeschlossenen Rechners wurden mit einer Kamera über das Programm AxioVision 3.1 (Zeiss) Aufnahmen der Ergebnisse angefertigt. Für eine optimale Bildqualität wurden die gefärbten Zellen noch vor der Eindeckelung in PBS fotografiert.

3.5 Verzeichnis der Hersteller

Alomone Labs., Jerusalem, Israel

Biother GmbH, D-65779 Kelkheim

Carl Zeiss MicroImaging GmbH, D-37081 Göttingen

Clontech, D-69126 Heidelberg

DAKO Diagnostics GmbH, D-22004 Hamburg

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, D-22083 Hamburg

Gibco BRL Life Technology GmbH, D-76131 Karlsruhe

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, D-91126 Schwabach

IKA-Werke GmbH & Co. KG, D-79219 Staufen im Breisgau

Invitrogen GmbH, D-76131 Karlsruhe

Karl Hecht Glaswarenfabrik GmbH & Co. KG, D-97647 Sondheim

Mallinckrodt Baker Chemicals, D-64347 Griesheim

Marienfeld Superior GmbH & Co. KG, D-97922 Lauda-Königshofen

Merck, D-64293 Darmstadt

Novus Biologicals, Littleton, CO 80160, USA

Nunc, D-65203 Wiesbaden

Roche Diagnostics GmbH, D-68305 Mannheim

Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California 95060, USA

Sigma, D-82041 Deisenhofen

Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL 35260, USA

Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ 08701, USA

4. Ergebnisse

4.1 Immunzytochemie an heterologen Expressionssystemen

Der größte Teil dieser Arbeit besteht aus immunzytochemischen Einzelfärbungen transfizierter Zellen. Es sollen Antikörper aus eigener Herstellung und kommerzielle Antikörper getestet werden, und zwar in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt. Da die verwendeten Antikörper alle aus Kaninchen entstammen, wurde in jedem Versuch, sofern nicht anders angegeben, als Sekundärantikörper der rot fluoreszierende IgG-AK Alexa Fluor® 546 Ziege-anti-Kaninchen, A-11010 (Molecular Probes) verwendet.

Zur Darstellung eventuell vorhandener Ko-Lokalisationen von grünen Fluoreszenzen des EGFPs (in den meisten Versuchen an eine geklonte *erg*-Kanaluntereinheit gekoppelt) und von roten Fluoreszenzen (diese entsprachen der Immunreaktionen der Antikörper), wurden mit Hilfe des Programms Corel-PHOTO PAINT Überlagerungsaufnahmen gefertigt. Diese ergaben bei einer 1:1-Deckungsgleichheit gelbe Fluoreszenzen.

4.1.1 *erg1*-Antikörper

Für die immunzytochemische Darstellung von *erg1*-Kanaluntereinheiten auf Proteinebene wurden die drei folgenden kommerziellen Antikörper, bei CHO- und HEK-Zellen, zuvor mit pcDNA3.1/*regr1*/EGFP transfiziert, eingesetzt:

- Anti-K_v 11.1 (*erg1*) Antikörper, #APC016 (Alomone Labs)
- Anti-hK_v 11.1 (HERG) Antikörper, #APC062 (Alomone Labs)
- Anti-HERG (H175) IgG Antikörper, sc-20130 (Santa Cruz Biotechnology)

Aufnahmen der Ergebnisse wurden angefertigt und sind in **Abb. 7**, **Abb. 8** bzw. **Abb. 11** dargestellt. Gezeigt wird deutlich die unterschiedliche Verteilung der Immunreaktivität

innerhalb der Zellen, vor allem im Zytoplasma. Der Zellkern und die Zellmembran wurden eher ausgespart. Dieses Verteilungsmuster entspricht Antikörpermarkierungen des Golgi-Apparates innerhalb der Zellen (Misumi et al., 1986; Fujiwara et al., 1988; Doms et al., 1989; Prestle et al., 1996).

Darüber hinaus sind CHO-Zellen und zusätzlich HEK-Zellen mit den Vektoren pcDNA3.1/rg1 (ohne Koppelung des erg1-Klons an EGFP) und pcDNA3.1/EGFP separat transfiziert worden.

4.1.1.1 Anti-K_v 11.1 (erg1) Antikörper, #APC016 (Alomone Labs)

Aufnahmen der Ergebnisse für den Antikörper #APC016 (Alomone Labs) zeigt **Abb. 7**. Dieser AK griff allgemein sehr schlecht an die erg-Kaliumkanaluntereinheiten, im Vergleich zu dem Anti-hK_v 11.1 (HERG) Antikörper, #APC062 (Alomone Labs). Dies traf insbesondere für die Versuche zu, in denen der #APC016-AK mit einer Verdünnung ab 1:200 eingesetzt wurde. Hierbei zeigten sich in den Ergebnissen nur sporadische Deckungsgleichungen der grünen und roten Fluoreszenzen. In niedrigen Verdünnungen eingesetzt, z.B. in einer Verdünnung von 1:100, konnte gesehen werden, dass dieser AK zusätzlich zu den klonierten erg1-Kaliumkanaluntereinheiten auch noch andere unspezifische Proteine anfärbte (Hintergrundfärbung).

Negativkontrollen, angefertigt mit pcDNA3.1/rg1/EGFP transfizierten CHO-Zellen ohne Primärantikörperzugabe, zeigten keine Färbungen in rot.

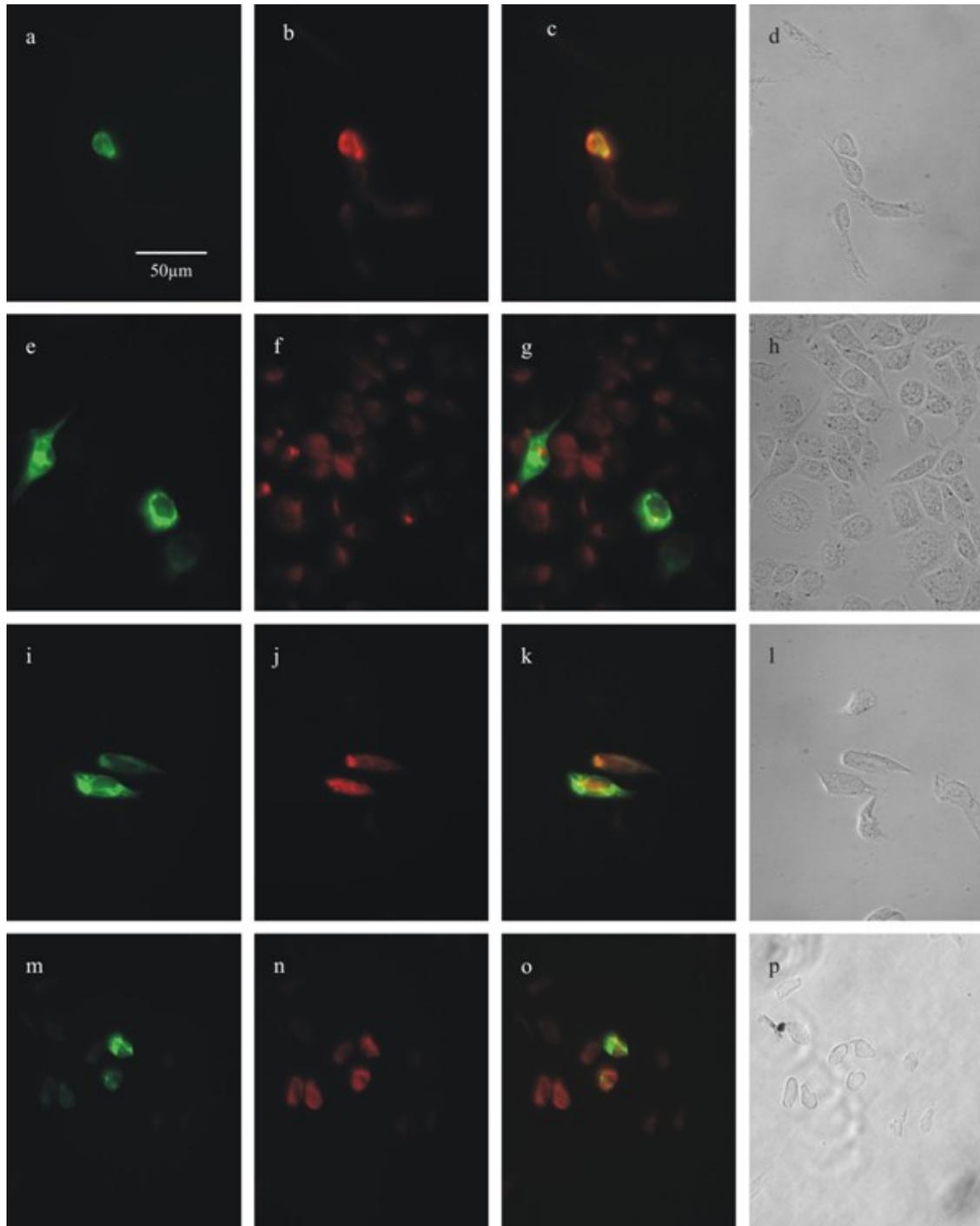


Abb. 7: Aufnahmen von CHO-Zellen, mit pcDNA3.1/erg1/EGFP transfiziert und mit Anti-K_v 11.1 (erg1) Antikörper, #APC016 (Alomone Labs) gefärbt. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **e**, **i** und **m** zeigen die Expression des EGFPs, welches an die erg1-Kanaluntereinheit gekoppelt ist. Die roten Fluoreszenzen in **b**, **f**, **j** und **n** zeigen die Markierungen mit den Antikörpern (primär und sekundär). **c**, **g**, **k** und **o** stellen Überlagerungen der Fluoreszenzen des EGFPs mit AK-Färbungen dar. In **d**, **h**, **l** und **p** sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen.

Verschiedene Verdünnungen des Primärantikörpers Anti-erg1, #APC016 (Alomone Labs) wurden wie folgt verwendet: **a-d**: 1:100, **e-l**: 1:200 und **m-p**: 1:400.

4.1.1.2 Anti-hK_v 11.1 (HERG) Antikörper, #APC062 (Alomone Labs)

pcDNA3.1/erg1/EGFP (*tagged*) transfizierte Zellen

Diese Immunzytochemie ist analog durchgeführt worden wie bereits in **4.1.1.1** beschrieben. Aufnahmen der Ergebnisse zeigt die folgende **Abb. 8**. In höherer Konzentration erbrachte diese bessere Deckungsgleichungen der grünen und roten Fluoreszenzen, insbesondere im Vergleich zu dem Anti-K_v 11.1 (erg1) Antikörper, #APC016 (Alomone Labs). Die besten Ergebnisse wurden bei einer Verdünnung von 1:400 erzielt. Dabei konnten deutlich subzelluläre Verteilungen gesehen werden.

Dieser Antikörper wurde für die ICC für die ko-transfizierten HEK-Zellen mit den Plasmiden pcDNA3.1/erg1 und pcDNA3.1/EGFP (s. nächsten Abschnitt dieses Kapitels) und die ICC des nativen Gewebes ausgewählt.

Negativkontrollen, angefertigt mit pcDNA3.1/erg1/EGFP transfizierten CHO-Zellen ohne Primärantikörperzugabe, ergaben keine roten Fluoreszenzen.

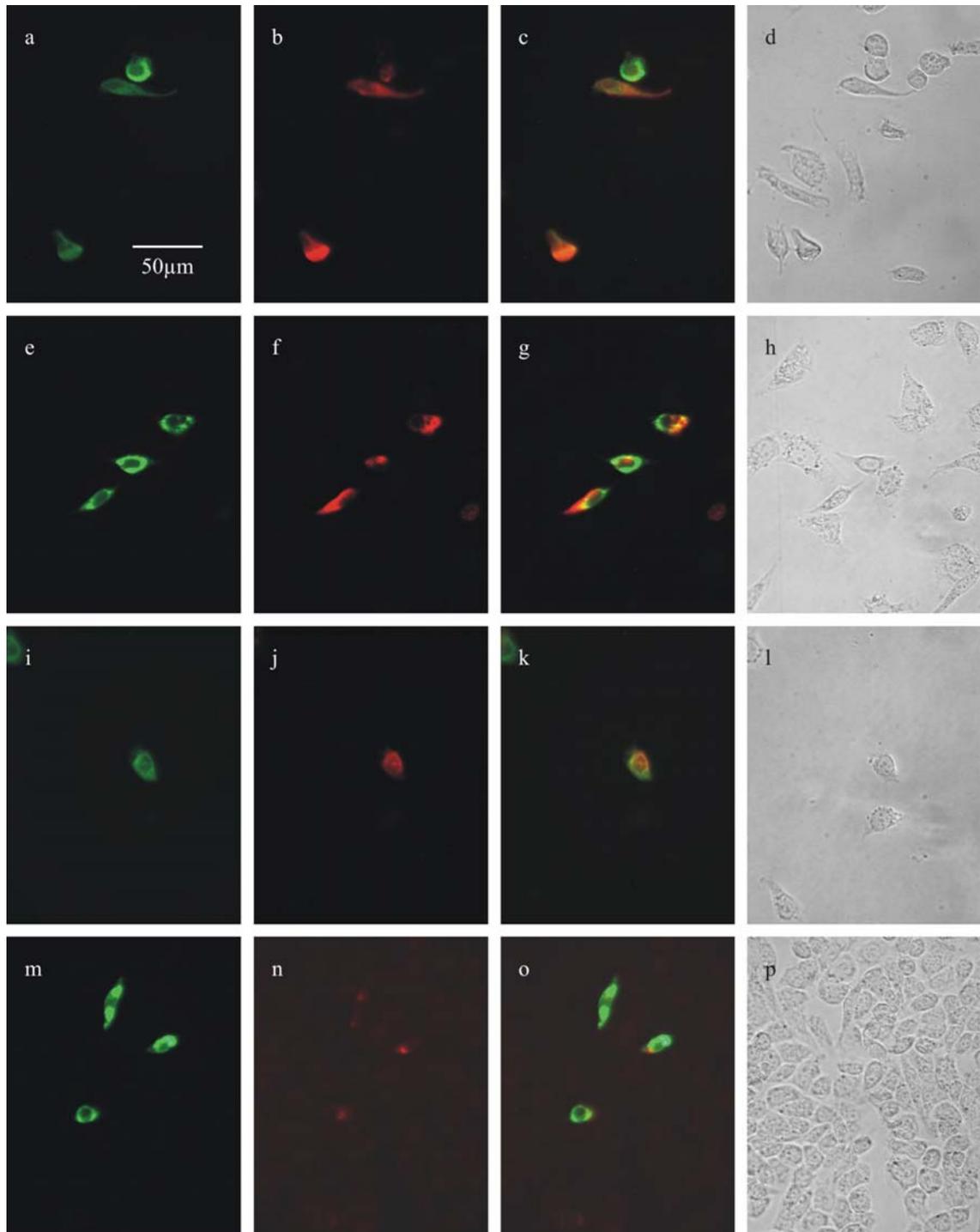


Abb. 8: Aufnahmen von CHO-Zellen, mit pcDNA3.1/erg1/EGFP transfiziert und mit Anti-hK, 11.1 (HERG) Antikörper, #APC062 (Alomone Labs) gefärbt. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **e**, **i** und **m** zeigen die Expression des EGFPs, welches an die erg1-Kanaluntereinheit gekoppelt ist. Die roten Fluoreszenzen in **b**, **f**, **j** und **n** zeigen die Markierungen mit den Antikörpern (primär und sekundär). **c**, **g**, **k** und **o** stellen die Überlagerungen der Fluoreszenzen des EGFPs mit AK-Färbungen dar. In **d**, **h**, **l** und **p** sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen. Verschiedene Verdünnungen des Antikörpers #062 (Alomone Labs) wurden wie folgt verwendet: **a-h**: 1:200, **i-l**: 1:400, **m-p**: 1:1000.

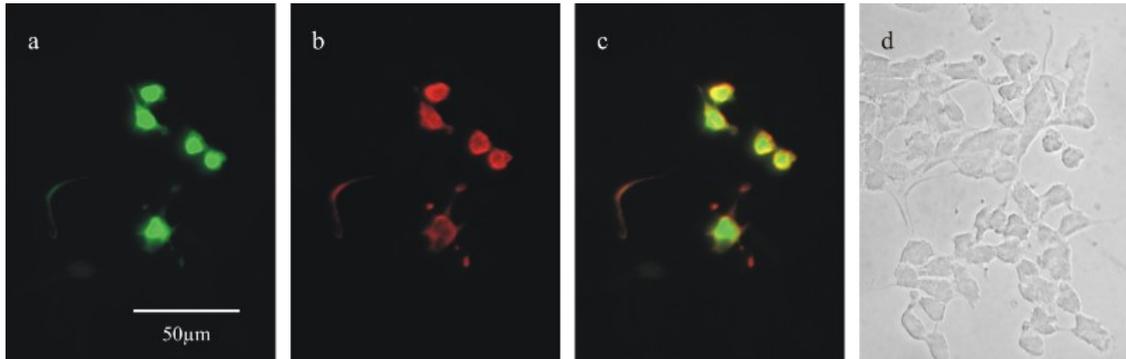
Ko-transfizierte Zellen mit pcDNA3/EGFP und pcDNA3/erg1 (*untagged*)

Der Anti-hK_v 11.1 (HERG) #APC062 (Alomone Labs) Antikörper wurde für die Ko-transfektion der CHO- und HEK-Zellen mit den Plasmiden pcDNA3.1/erg1 und pcDNA3.1/EGFP unter den gegen die erg1-Kanaluntereinheit getesteten Antikörpern ausgewählt, da er die beste Deckungsgleichung von dem EGFP an die geklonte erg1-Kanaluntereinheit und den roten Fluoreszenzen (Immunreaktion der Antikörper) zeigte (Vgl. **Abb. 7** und **Abb. 8**, s. auch Diskussion).

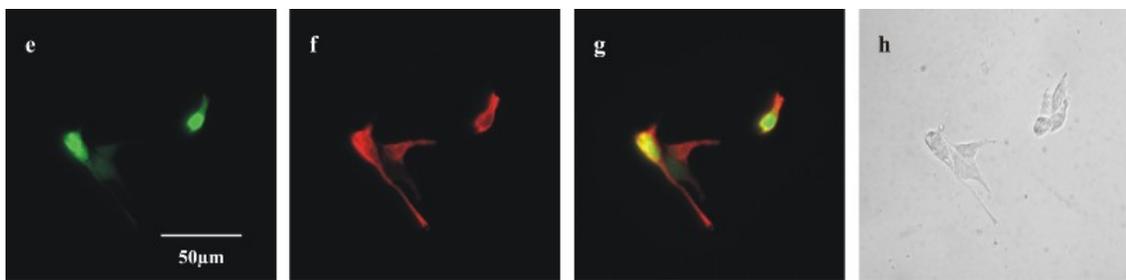
Ergebnisse dieses Versuchs für die Transfektion der HEK-Zellen werden in **Abb.9** und die für die Transfektion der CHO-Zellen in **Abb. 10** gezeigt. Bei deren immunzytochemischen Färbungen war ein deutliches, subzelluläres Verteilungsmuster der Immunreaktion der Antikörper (rote Fluoreszenz) zu sehen. EGFP fluoreszierte sehr homogen, dazu durchweg kräftig. Hier war keine intrazellulär unterschiedliche Verteilung zu erkennen.

Während der Transfektion wurden wahrscheinlich einzelne Zellen entweder bevorzugt mit dem *untagged* Plasmid pcDNA3.1/erg1, oder mit dem Plasmid für EGFP kodierend oder auch mit beiden Vektoren transfiziert. Einige Immunreaktionen konnten deshalb auch an Zellen festgestellt werden, die zuvor nur mit dem *untagged* Plasmid für die erg1-Kanaluntereinheit transfiziert wurden, jedoch nicht mit pcDNA3.1/EGFP. Diese entsprechenden Zellen fluoreszierten rot, allerdings nicht grün (s. **Abb. 9**). Nur grün fluoreszierende Zellen (also nicht rot fluoreszierend) waren vermutlich zuvor nur mit dem Plasmid, für EGFP kodierend, transfiziert worden. Einige Zellen, die weder rot noch grün fluoreszierten, wurden während des Versuchs somit gar nicht transfiziert.

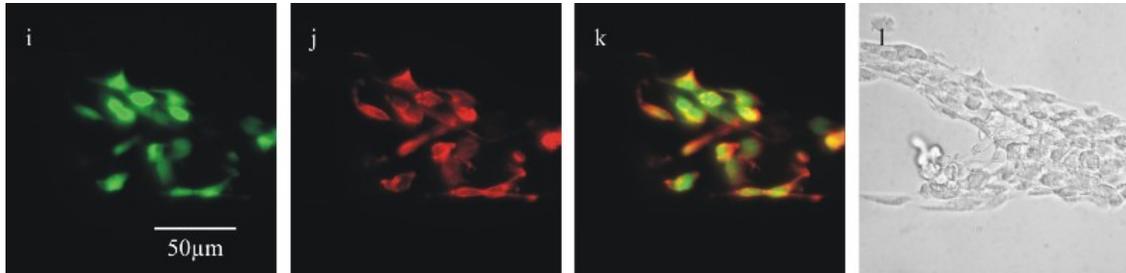
1. HEK-Zellen



I) Verd. 1:1000



II) Verd. 1:5000



III) Verd. 1:10000

Abb. 9: Aufnahmen von HEK-Zellen separat mit pcDNA3.1/erg1 und pcDNA3/EGFP transfiziert und mit Anti-hK_v 11.1 (HERG) Antikörper, #APC062 (Alomone Labs) gefärbt. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **e** und **i** zeigen die Expression des EGFPs, welches an die erg1-Kanaluntereinheit gekoppelt ist. Die roten Fluoreszenzen in **b**, **f** und **j** stellen die Markierungen mit den Antikörpern (primär und sekundär) dar. **c**, **g** und **k** zeigen Überlagerungen der Fluoreszenzen des EGFPs mit AK-Färbungen dar. **d**, **h** und **l** zeigen die Zellen in Nativaufnahmen.

Die EGFP-Kopplung an den erg-Plasmiden bei den *tagged* Klonen behindert teilweise das Andocken von Antikörpern. Demzufolge wurde bei Immunzytochemie Ko-transfizierter Zellen mit pcDNA3.1/erg1 und pcDNA3/EGFP viel stärkere

Verdünnungen des Primärantikörpers verwendet als bei der Immunzytochemie mit zuvor transfizierten *tagged* Klonen.

Negativkontrollen, angefertigt mit pcDNA3.1/rgf1 und pcDNA3/EGFP separat transfizierten HEK-Zellen ohne Primärantikörperzugabe, zeigten keine Färbungen in rot. Der gleiche Versuch wurde mit CHO-Zellen wiederholt, s. **Abb. 10**. Bezüglich des roten Fluoreszenzmusters zeigte sich eine ähnliche Verteilung wie bei dem Versuch analog zu diesem, mit HEK-Zellen durchgeführt. Jedoch wurde bei den HEK-Zellen eine höhere Kanaldichte exprimiert. Aufgrund dessen zeigte sich insbesondere bezüglich der Intensität, eine unterschiedliche Distribution des Verteilungsmusters.

2.CHO-Zellen

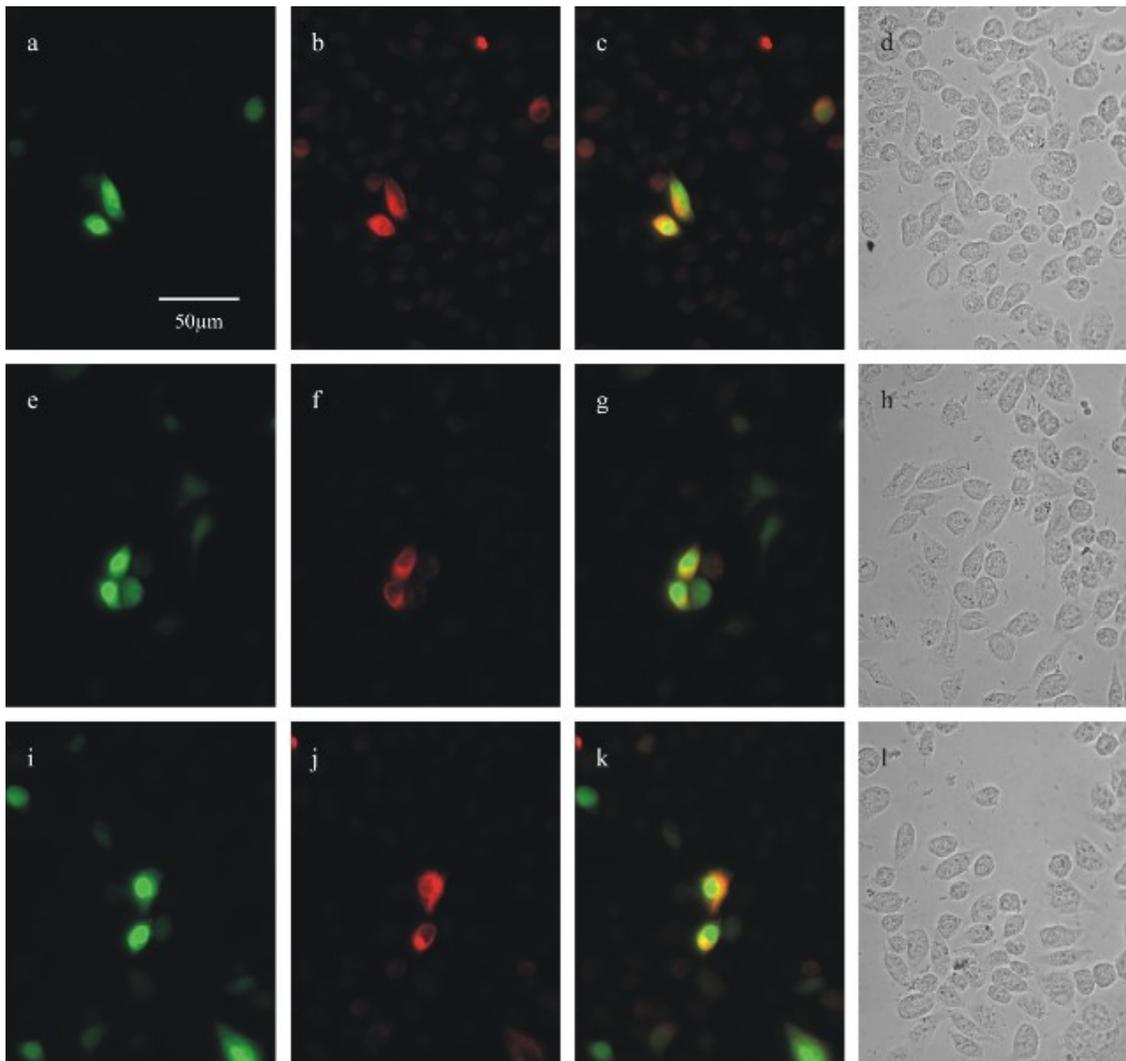


Abb. 10: Aufnahmen von CHO-Zellen, die separat mit pcDNA3.1/erg1 und pcDNA3/EGFP transfiziert und mit Anti-hK_v 11.1 (HERG) Antikörper, #APC062 (Alomone Labs) gefärbt sind. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **e** und **i** zeigen die Expression des EGFPs. Die roten Fluoreszenzen in **b**, **f** und **j** zeigen die Markierungen mit den Antikörpern (primär und sekundär). **c**, **g** und **k** stellen die Überlagerungen der Fluoreszenzen des EGFPs und die der mit AK-markierten erg1-Kanaluntereinheiten dar. In **d**, **h** und **l** sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen.

a-d wurden bei einer Verdünnung von 1:1000 aufgenommen, **e-h** bei 1:5000 und **i-l** bei 1:10000.

Negativkontrollen, angefertigt mit pcDNA3.1/erg1 und pcDNA3/EGFP separat transfizierten CHO-Zellen ohne Primärantikörperzugabe, zeigten keine Färbungen in rot.

4.1.1.3 Anti-HERG (H175) IgG Antikörper, sc-20130 (Santa Cruz Biotechnology)

Dieser Antikörper war ein weiterer AK, der gegen die erg1-Kanaluntereinheit getestet wurde. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht zufrieden stellend (**Abb. 11**), da nur sporadische Ko-Lokalisationen der roten und grünen Fluoreszenzen erzielt werden konnten. Des Weiteren färbte er in niedrigen Verdünnungen, wobei die Immunreaktion der Antikörper intrazellulär zu erkennen war, sehr viel Hintergrund. Aus diesem Grund wurde er auch nicht bei der späteren Testung am nativen Gewebe (Bulbus olfactorius) verwendet.

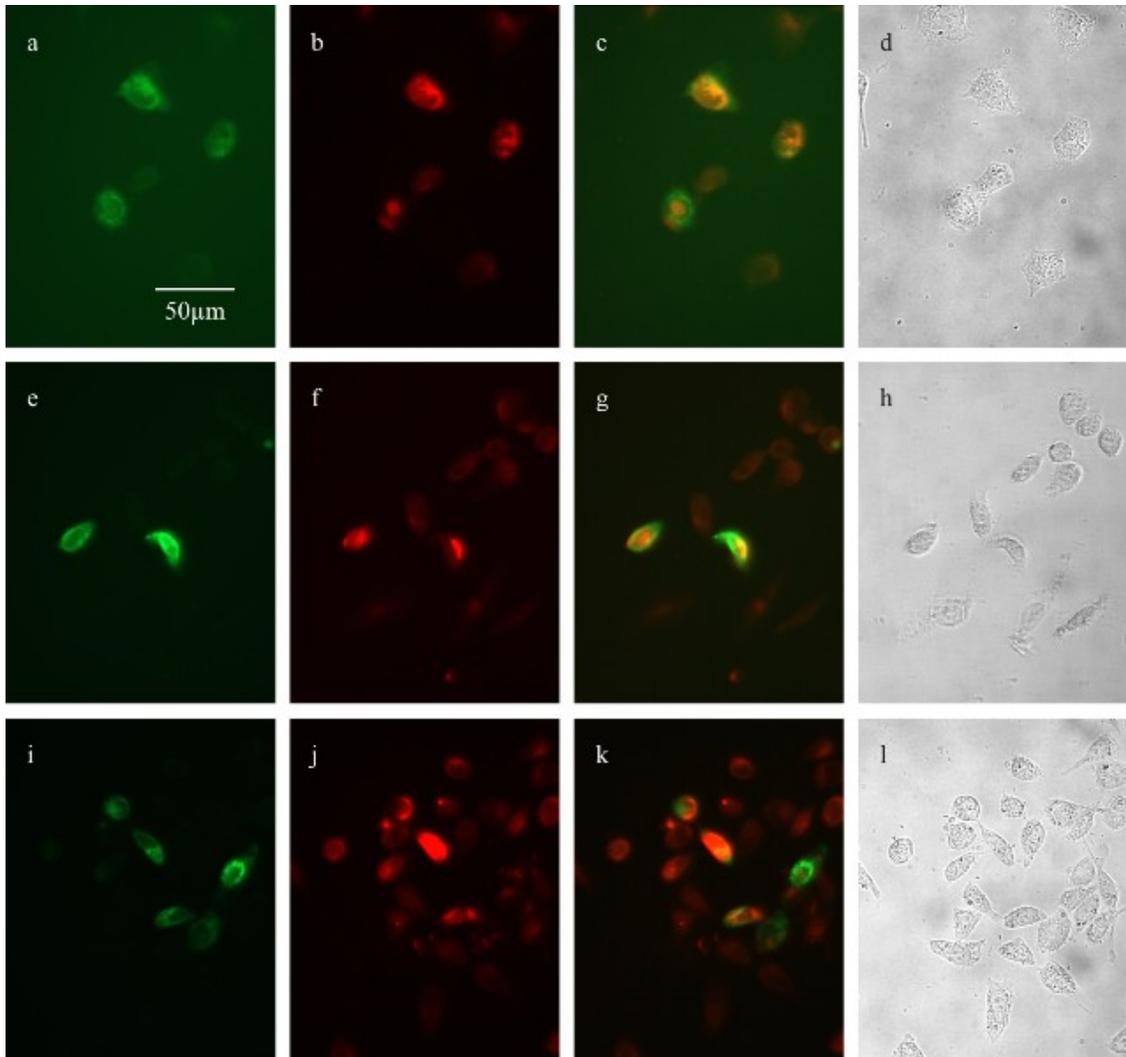


Abb. 11: Aufnahmen von CHO-Zellen, die mit pcDNA3.1/erg1/EGFP transfiziert und mit Anti-HERG (H175) IgG Antikörper, sc-20130 (Santa Cruz Biotechnology) gefärbt sind. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **e** und **i** zeigen die Expression des EGFPs, welches an die erg1-Kanaluntereinheit gekoppelt ist. Die roten Fluoreszenzen in **b**, **f** und **j** stellen die Markierungen mit den Antikörpern (primär und sekundär) dar. **c**, **g** und **k** zeigen die Überlagerungen der Fluoreszenzen des EGFPs mit AK-Färbungen dar. **d**, **h** und **l** stellen die Zellen in Nativaufnahmen dar.

Verschiedene Verdünnungen wurden wie folgt verwendet: **a-d**: 1:100, **e-h**: 1:200, **i-l**: 1:400.

Negativkontrollen, angefertigt mit pcDNA3.1/erg1/EGFP transfizierten CHO-Zellen ohne Primärantikörperzugabe, zeigten keine Immunreaktionen.

4.1.2 erg2-Antikörper

Die erg2-Kanaluntereinheiten sind immunzytochemisch durch zwei ähnliche Antikörper aus eigener Produktion, CR1 und CR2, zu erkennen gewesen (s. Material und Methoden), sowie auch durch einen kommerziellen Antikörper, den Anti-K_v 11.2 (erg2) Antikörper, #APC114 (Alomone Labs). Die verwendeten Zellen wurden vorher mit pc/DNA3.1/erg2/EGFP transfiziert. Aufnahmen der Ergebnisse zeigen **Abb.12** bis **Abb.18**. Man sieht, noch ausgeprägter als bei der Darstellung der erg1-Kanaluntereinheit, eine deutliche Aussparung des Zellkerns und die intensive Färbung des Zytoplasmas. Andere Zellen wurden analog zu der Methode in **4.1.1** separat mit den Plasmiden pcDNA3.1/erg2 (ohne EGFP-Koppelung) und pcDNA3.1/EGFP transfiziert.

Negativkontrollen, angefertigt ohne Primärantikörperzugabe, transfiziert mit entweder pcDNA3.1/erg2/EGFP oder mit pcDNA3.1/erg2 und pcDNA3.1/EGFP, zeigten alle keine Fluoreszenzen in rot.

4.1.2.1 CR1-Antikörper (Eigenherstellung)

pcDNA3.1/erg2/EGFP (tagged) transfizierte Zellen

Mit diesem Antikörper konnte ein sehr gutes intrazelluläres Verteilungsmuster der Immunreaktion für beide CHO- und HEK-Zellsysteme erzeugt werden. Selbst bei sehr niedrigen Konzentrationen (1:10000) ergab sich immer noch eine 1:1-Ko-Lokalisation der grünen und roten Fluoreszenzen, welche **Abb. 12** (die der CHO-Zellen) und **Abb. 13** (die der HEK-Zellen) zeigen. Was die Hintergrundfärbung anging, erbrachte der CR1-AK zufriedenstellende Ergebnisse. Dieser wurde für den späteren Nachweis von erg2-Kaliumkanaluntereinheiten an den Präparaten des Bulbus olfactorius ausgewählt.

1. CHO-Zellen

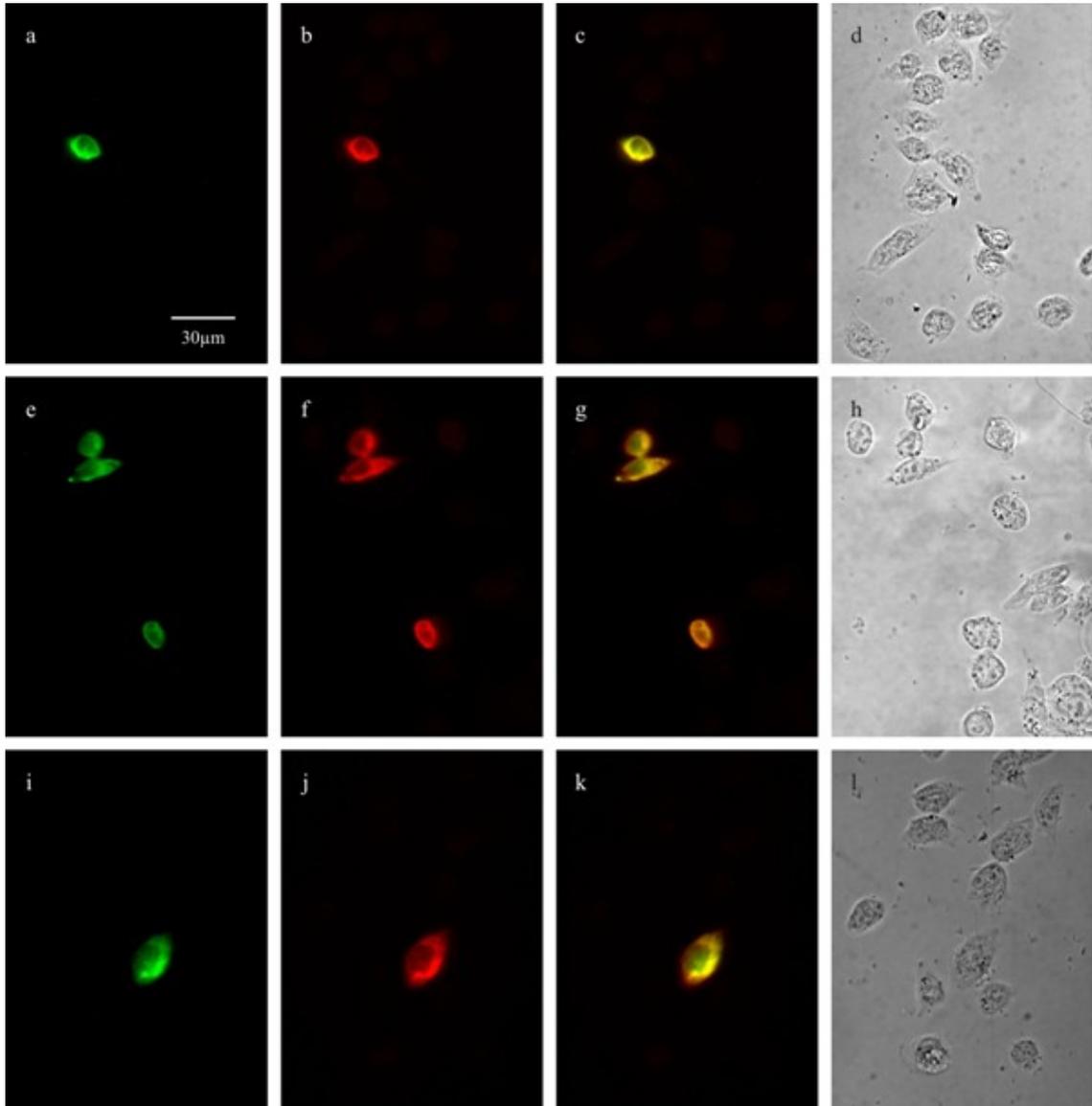


Abb. 12: Aufnahmen der Ergebnisse von CHO-Zellen, die mit pcDNA3.1/erg2/EGFP transfiziert und mit CR1 (aus Eigenherstellung) gefärbt sind. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **e** und **i** stellen die Expression des EGFPs dar, welches an die erg2-Kanaluntereinheit gekoppelt ist. Die roten Fluoreszenzen in **b**, **f** und **j** zeigen die Markierungen mit den Antikörpern (primär und sekundär). **c**, **g** und **k** stellen die Überlagerungen der Fluoreszenzen des EGFPs mit AK-Färbungen dar. **d**, **h** und **l** zeigen die Zellen in Nativaufnahmen. Verdünnungen: **a-d**: 1:2000, **e-h**: 1:5000, **i-l**: 1:10000.

2.HEK-Zellen

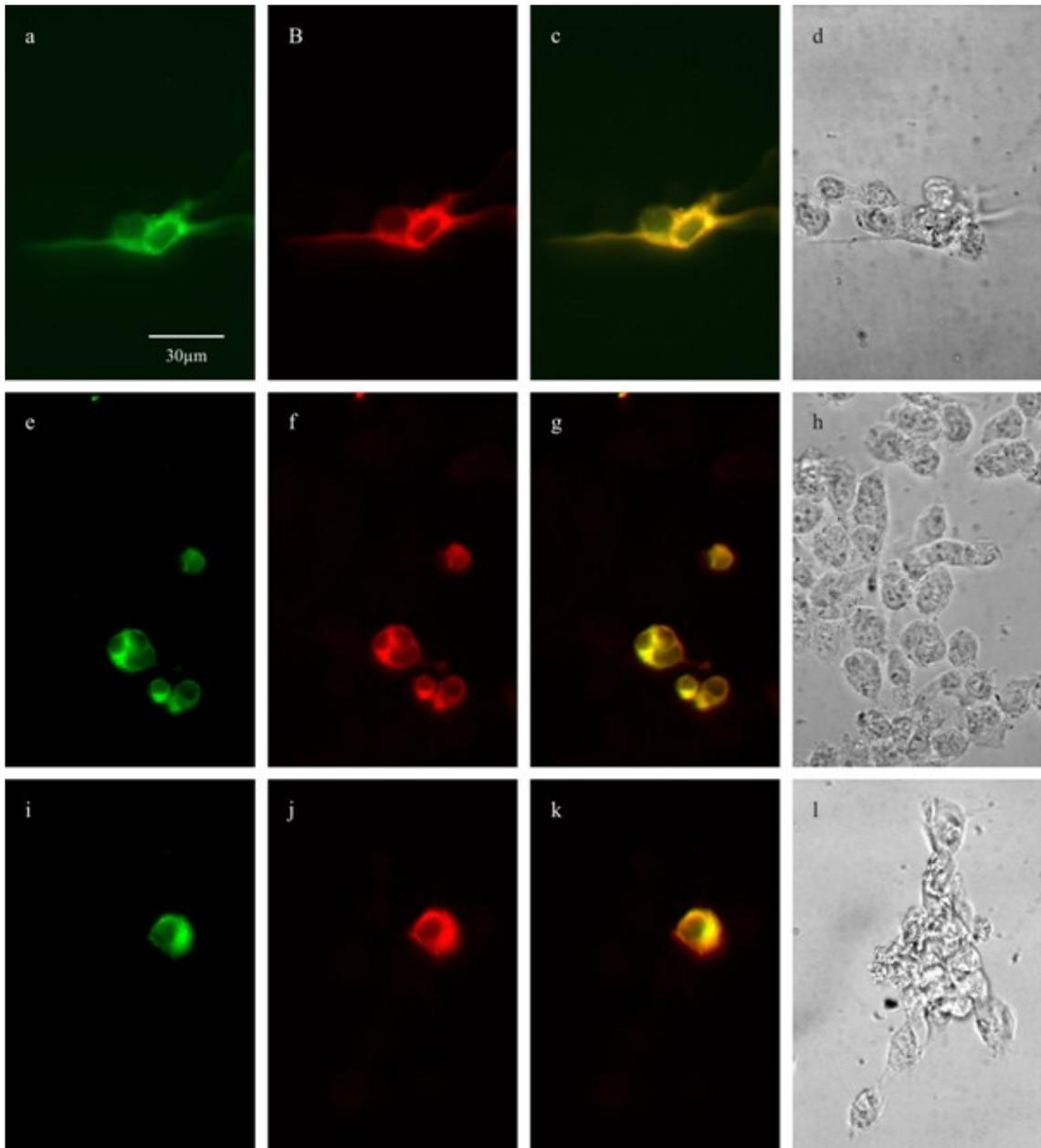


Abb. 13: Aufnahmen der Ergebnisse von HEK-Zellen, die mit pcDNA3.1/erg2/EGFP transfiziert und mit CR1 (aus Eigenherstellung) gefärbt sind. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **e** und **i** stellen die Expression des EGFPs dar, welches an die erg2-Kanaluntereinheit gekoppelt ist. Die roten Fluoreszenzen in **b**, **f** und **j** zeigen die Markierungen mit den Antikörpern (primär und sekundär). **c**, **g** und **k** stellen die Überlagerungen der Fluoreszenzen des EGFPs mit AK-Färbungen dar. In **d**, **h** und **l** sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen. Verdünnungen: **a-d**: 1:2000, **e-h**: 1:5000, **i-l**: 1:10000.

Ko-transfizierte Zellen, mit pcDNA3/EGFP und pcDNA3/erg2 (*untagged*)

1. CHO-Zellen

Der CR1-Antikörper aus eigener Herstellung zeigte im Vergleich zu allen anderen AK gegen erg2-Kanäle die bessere Ko-Lokalisation des EGFPs an die geklonte erg2-Kanaluntereinheit und der roten Fluoreszenzen (Immunreaktion des Antikörpers; vgl. **Abb. 12** und **Abb. 13** mit **Abb. 16** und **Abb. 17**). Deshalb wurde dieser für die Ko-transfektion der Zellen mit den Vektoren pcDNA3.1/erg2 und pcDNA3.1/EGFP ausgewählt. Ergebnisse dieser Versuche stellen **Abb.14** und **Abb.15** dar.

Auch hier sieht man deutlich die intensive und gleichmäßig grüne Fluoreszenz des EGFPs. Die Immunreaktionen des CR1 in beiden Zellsystemen, mit zuvor transfizierten *untagged* Klonen (**Abb.12** und **Abb. 13**), zeigten sich viel kräftiger als bei jenen, die zuvor mit *tagged* Klonen transfiziert wurden (**Abb.14** und **Abb.15**, s. auch Diskussion).

Zusätzlich kann in **Abb. 14** und in **Abb. 15** gesehen werden, dass einige Zellen nur mit pcDNA3.1/EGFP transfiziert grün, jedoch nicht rot fluoreszierten. Andere, die nur mit pcDNA3.1/erg2 transfiziert wurden, fluoreszierten rot. Jedoch fluoreszierten diese nicht grün. Zahlreiche Zellen zeigten auch, dass sie mit beiden Vektoren, pcDNA3/EGFP und pcDNA3/erg2, transfiziert wurden. Diese fluoreszierten rot und grün.

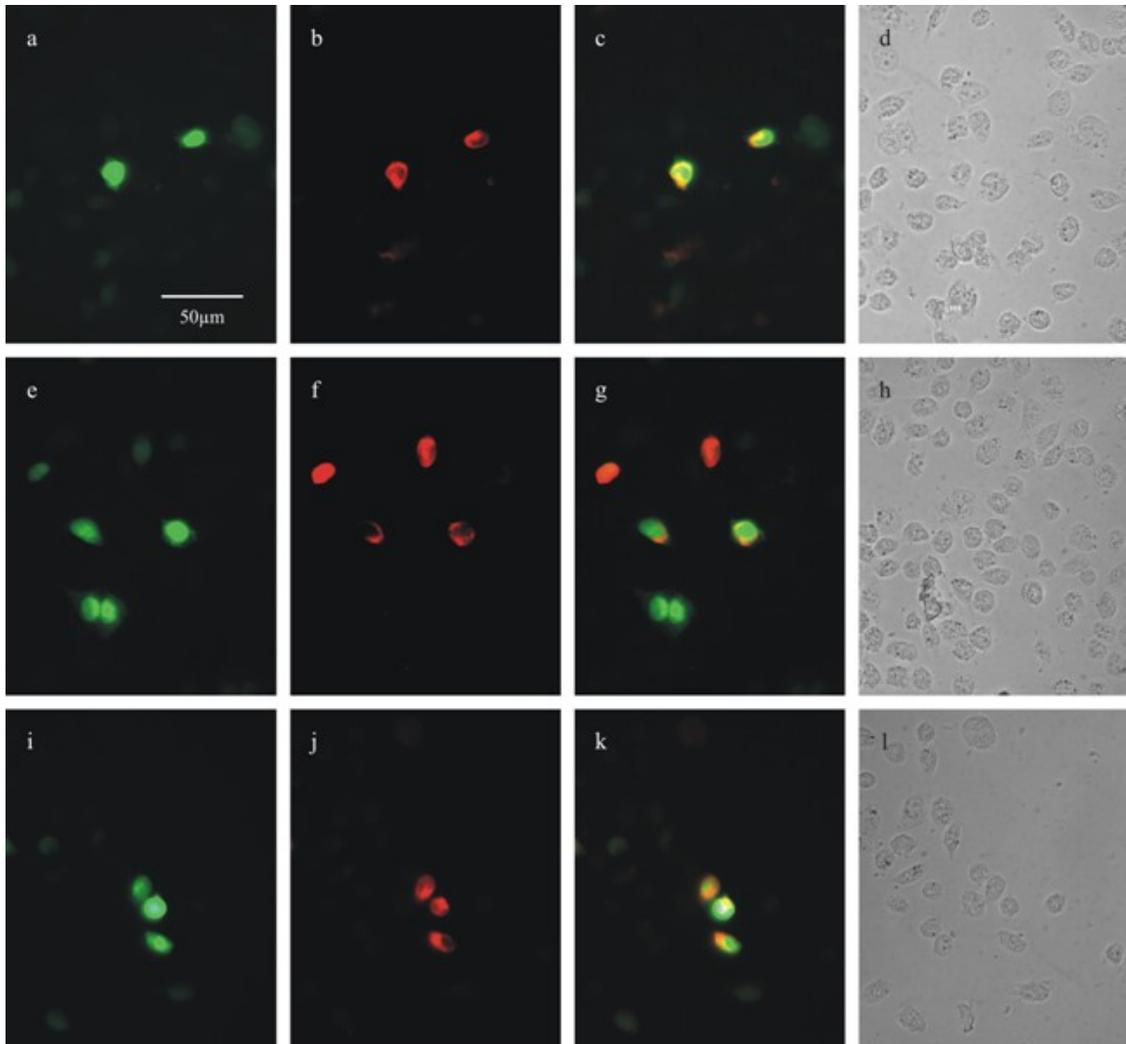
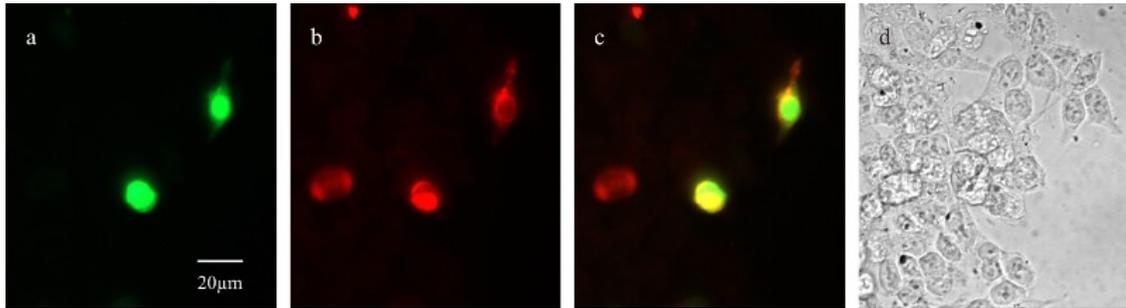
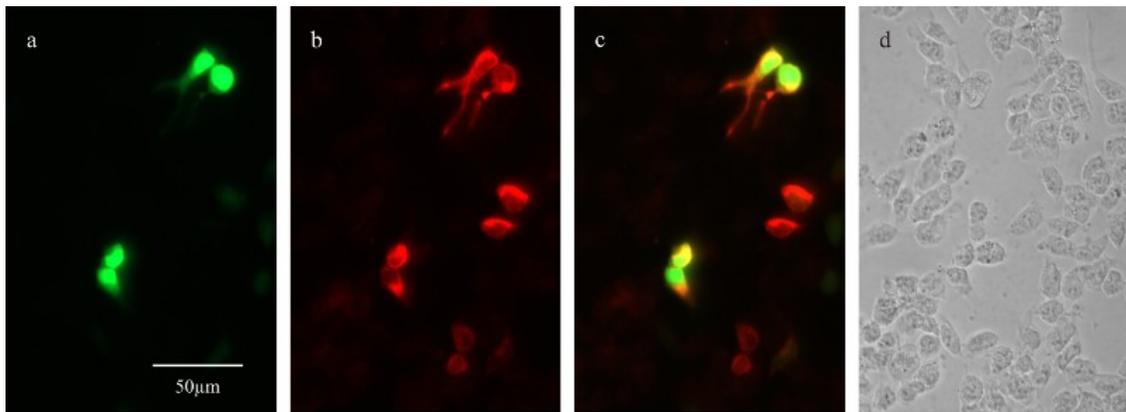


Abb. 14: Aufnahmen von CHO-Zellen, die separat mit pcDNA3.1/erg2 und pcDNA3/EGFP transfiziert und mit CR1 (aus Eigenherstellung) gefärbt sind. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **e** und **i** zeigen die Expression des EGFPs. Die roten Fluoreszenzen in **b**, **f** und **j** stellen die Markierungen der erg2-Untereinheiten mit den Antikörpern (primär und sekundär) dar. **c**, **g** und **k** stellen die Überlagerungen der Fluoreszenzen der erg2-Kanaluntereinheiten mit AK-Färbungen dar. In **d**, **h** und **l** sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen (Vgl. **Abb. 9**, HEK-Zellen). Verdünnungen: **a-d**: 1:2000, **e-h**: 1:5000, **i-l** 1:10000.

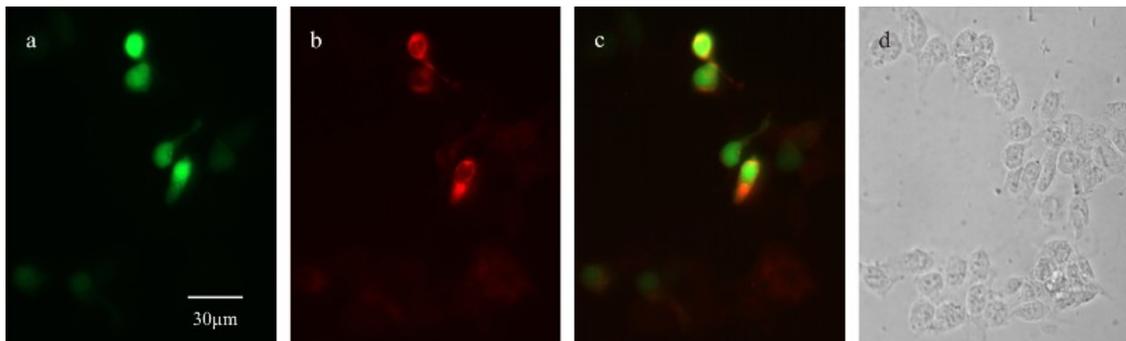
2. HEK-Zellen



I) Verdünnung 1:2000



II) Verdünnung 1:5000



III) Verdünnung 1:10000

Abb. 15: Aufnahmen von HEK-Zellen, die separat mit pcDNA3.1/erg2 und pcDNA3/EGFP transfiziert und mit CR1 (aus Eigenherstellung) gefärbt sind. Die grünen Fluoreszenzen in **I) a**, **II) a** und **III) a** zeigen die Expression des EGFPs. Die roten Fluoreszenzen in **I) b**, **II) b** und **III) b** zeigen die Markierungen der erg2-Untereinheiten mit den Antikörpern (primär und sekundär). **I) c**, **II) c** und **III) c** stellen die Überlagerungen der erg2-Kanaluntereinheiten mit AK-Färbungen dar. In **I) d**, **II) d** und **III) d** sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen.

4.1.2.2 CR2-Antikörper (Eigenherstellung)

Dieser AK zeigte sich bezüglich der subzellulären Darstellung von intrazellulären Verteilungsmustern zufriedenstellend bei allen eingesetzten Verdünnungen. Jedoch verursachte er extrem viel Hintergrundfärbungen in den CHO- und HEK-Zellen, so dass man kaum noch unterscheiden konnte, welche Zellen in Wirklichkeit erfolgreich transfiziert wurden. Ansonsten zeigte der CR2-AK wie der CR1-AK ähnlich gute, wenn nicht sogar noch hervorragendere 1:1-Deckungsgleichungen der Immunreaktionen im Vergleich.

1. CHO-Zellen

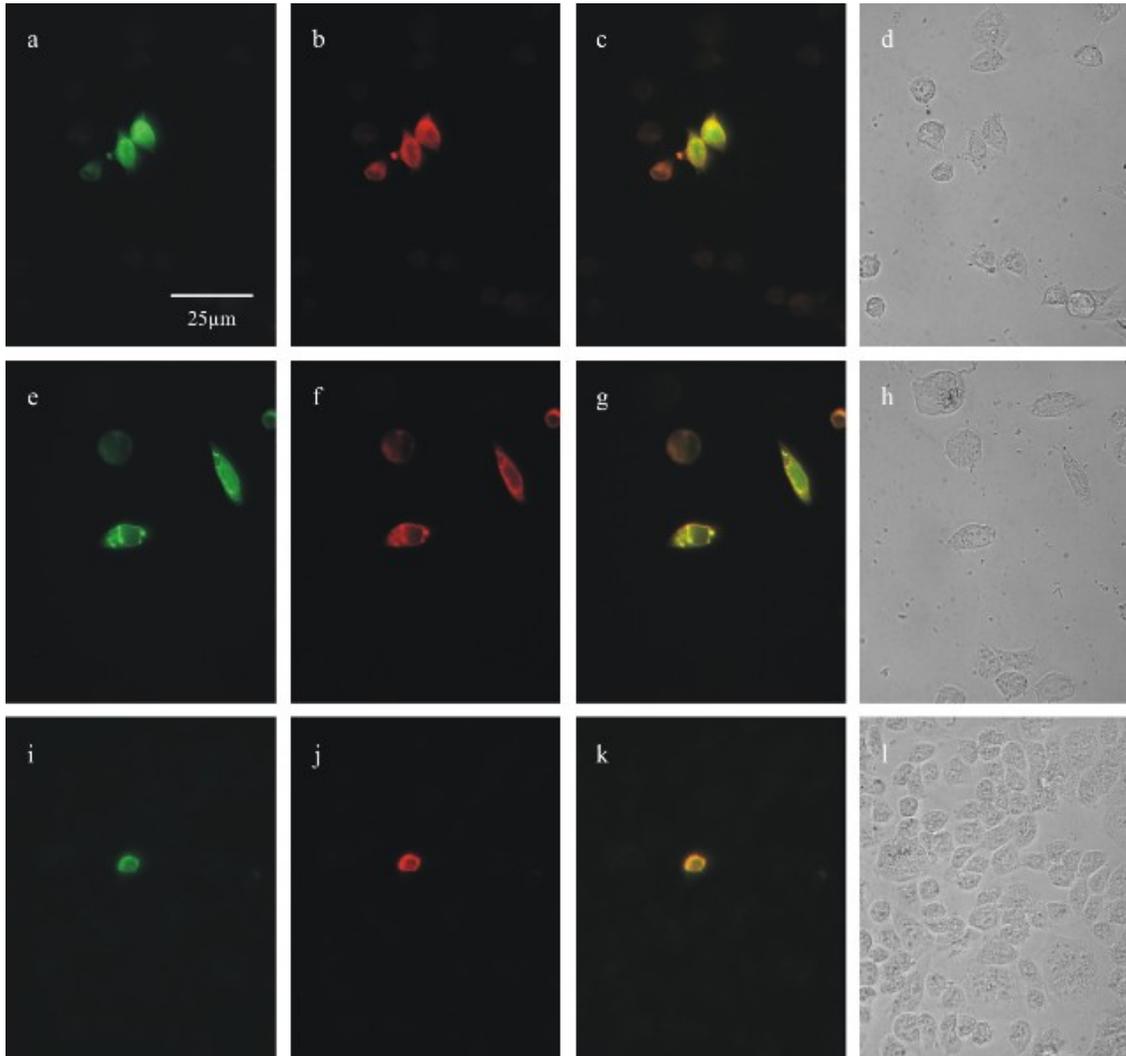


Abb. 16: Aufnahmen der Ergebnisse von CHO-Zellen, die mit pcDNA3.1/erg2/EGFP transfiziert und mit CR2 (aus Eigenherstellung) gefärbt sind. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **e** und **i** zeigen die Expression des EGFPs, welches an die erg2-Kanaluntereinheit gekoppelt ist. Die roten Fluoreszenzen in **b**, **f** und **j** stellen die Markierungen mit den Antikörpern (primär und sekundär). **c**, **g** und **k** zeigen die Überlagerungen der Fluoreszenzen des EGFPs mit AK-Färbungen dar. In **d**, **h** und **l** sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen. Verdünnungen: **a-d**: 1:1000, **e-h**: 1:5000, **i-l**: 1:10000.

2.HEK-Zellen

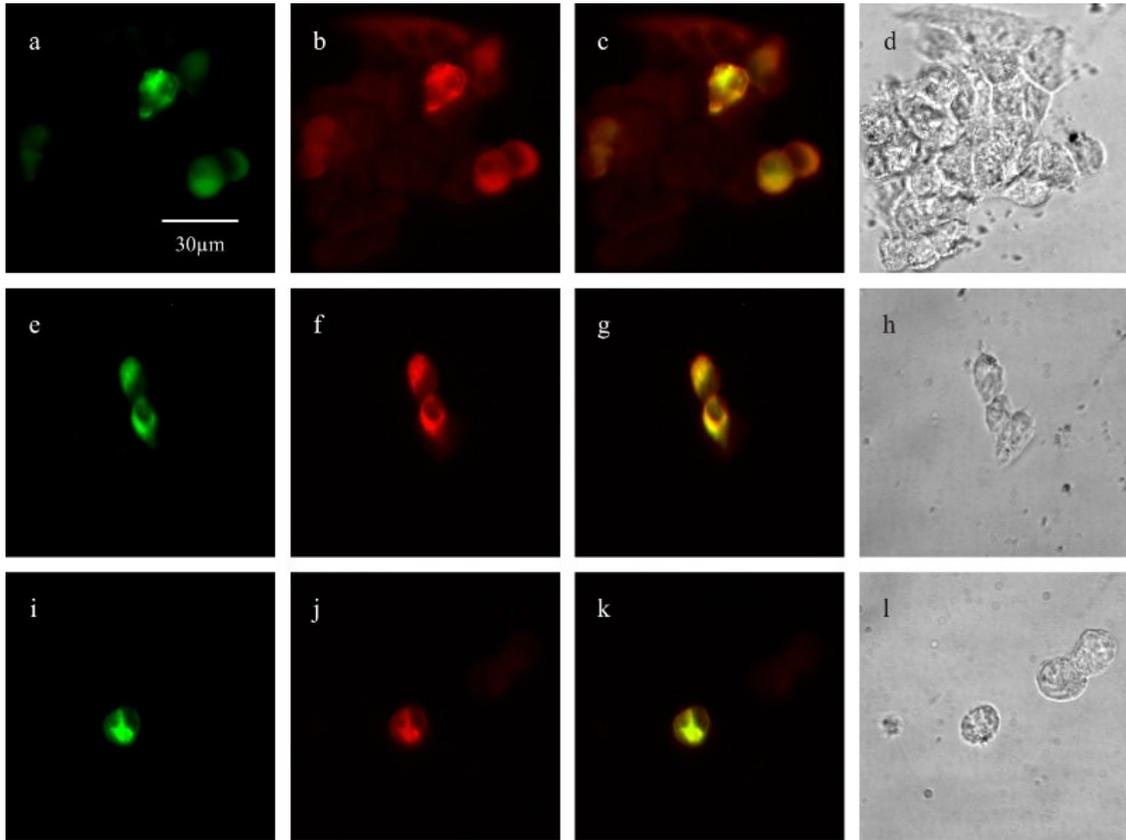


Abb. 17: Aufnahmen der Ergebnisse von HEK-Zellen, die mit pcDNA3.1/erg2/EGFP transfiziert und mit CR2 (aus Eigenherstellung) gefärbt sind. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **e** und **i** zeigen die Expression des EGFPs, welches an die erg2-Kanaluntereinheit gekoppelt ist. Die roten Fluoreszenzen in **b**, **f** und **j** zeigen die Markierungen mit den Antikörpern (primär und sekundär). **c**, **g** und **k** stellen die Überlagerungen der Fluoreszenzen des EGFPs mit AK-Färbungen dar. In **d**, **h** und **l** sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen.
Verdünnungen: **a-d**: 1:2000, **e-h**: 1:5000, **i-l**: 1:10000.

4.1.2.3 ICC mit Anti-K_v11.2 (erg2) Antikörper, #APC114 (Alomone Labs)

Ergebnisse von pcDNA3.1/erg2/EGFP transfizierten CHO-Zellen, mit #APC114-AK in verschiedenen Verdünnungen gefärbt, sind in **Abb. 18** dargestellt. Im Allgemeinen zeigte er eingesetzt in höheren Konzentrationen (z.B. bei 1:500) nur schwache, nicht zufriedenstellende Immunreaktionen des subzellulären Verteilungsmusters. Er färbte sehr viele Hintergrundproteine, wenn diese niedrigen Verdünnungen eingesetzt wurden.

Aus diesem Grunde wurde er für die Immunzytochemie des nativen Gewebes nicht verwendet.

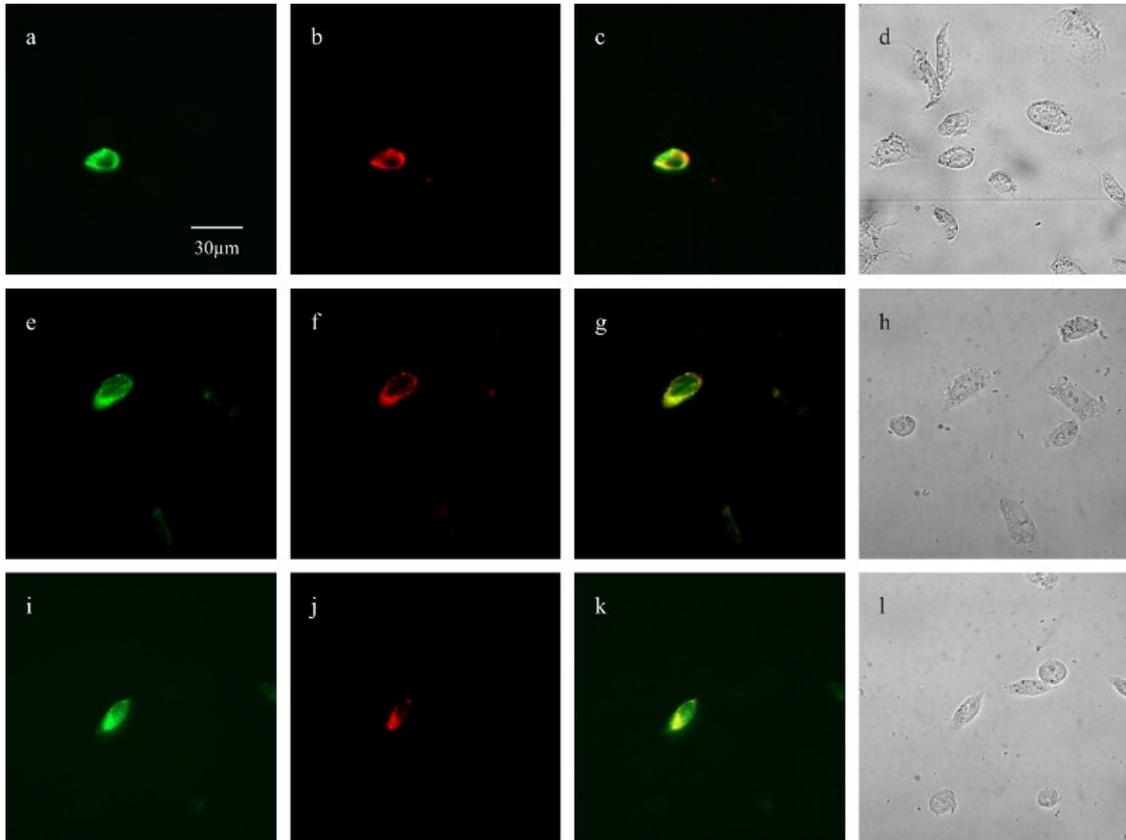


Abb. 18: Aufnahmen der Ergebnisse von CHO-Zellen, die mit pcDNA3.1/erg2/EGFP transfiziert und mit Anti-K_v 11.2 (erg2) Antikörper, #APC114 (Alomone Labs) gefärbt sind. Die grünen Fluoreszenzen in a, e und i zeigen die Expression des EGFPs, welches an die erg2-Kanaluntereinheit gekoppelt ist. Die roten Fluoreszenzen in b, f und j zeigen die Markierung mit den Antikörpern (primär und sekundär). c, g und k stellen die Überlagerungen der Fluoreszenzen des EGFPs mit AK-Färbungen dar. In d, h und l sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen. Verdünnungen: a-d: 1:500, e-h: 1:1000, i-l: 1:5000.

Verdünnungen mit 1:10000 für den Antikörper Anti-K_v 11.2 (erg2), #APC114 (Alomone Labs) wurden ebenfalls angesetzt. Da der Antikörper in niedrigen Konzentrationen sehr schlecht griff, sind hierzu keine Aufnahmen dargestellt.

4.1.3 erg3-Antikörper

Die in Kapitel 3.4.1.1 beschriebenen Antikörper aus eigener Produktion, TB1 und TB2, wurden getestet, ob sie für die immunzytochemische Darstellung der Kaliumkanaluntereinheit erg3 geeignet sind. Diese wurden, wie bei der Immunzytochemie der Kanaluntereinheiten erg1 und erg2, auf zuvor transfizierten CHO- und HEK-Zellen in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt. In diesem Fall wurde für diesen Zweck der Transfektionsvektor pcDNA3.1/erg3/EGFP in zwei Ansätzen, *tagged* und *untagged*, angewendet.

4.1.3.1 TB1-Antikörper (Eigenherstellung)

Fotos von den Ergebnissen sind in den **Abb. 19** und **20** dargestellt. Man sieht, dass der Antikörper bei den transfizierten HEK-Zellen viel deutlicher und optisch schöner die entsprechenden Epitope an den erg-Kanaluntereinheiten gegriffen hat als bei den CHO-Zellen, wenn man die beiden Abbildungen miteinander vergleicht (viel bessere Deckungsgleichung von rot und grün bei den HEK-Zellen). Auch in niedrig eingesetzten Verdünnungen zeigte er eine gute Darstellung des intrazellulären Verteilungsmusters. Dieser Antikörper färbte, im Vergleich zu dem ähnlichen TB2-AK mehr Hintergrund. Aus diesem Grund wurde der letztere für die Immunzytochemie des nativen Gewebes dem anderen vorgezogen.

1.CHO-Zellen

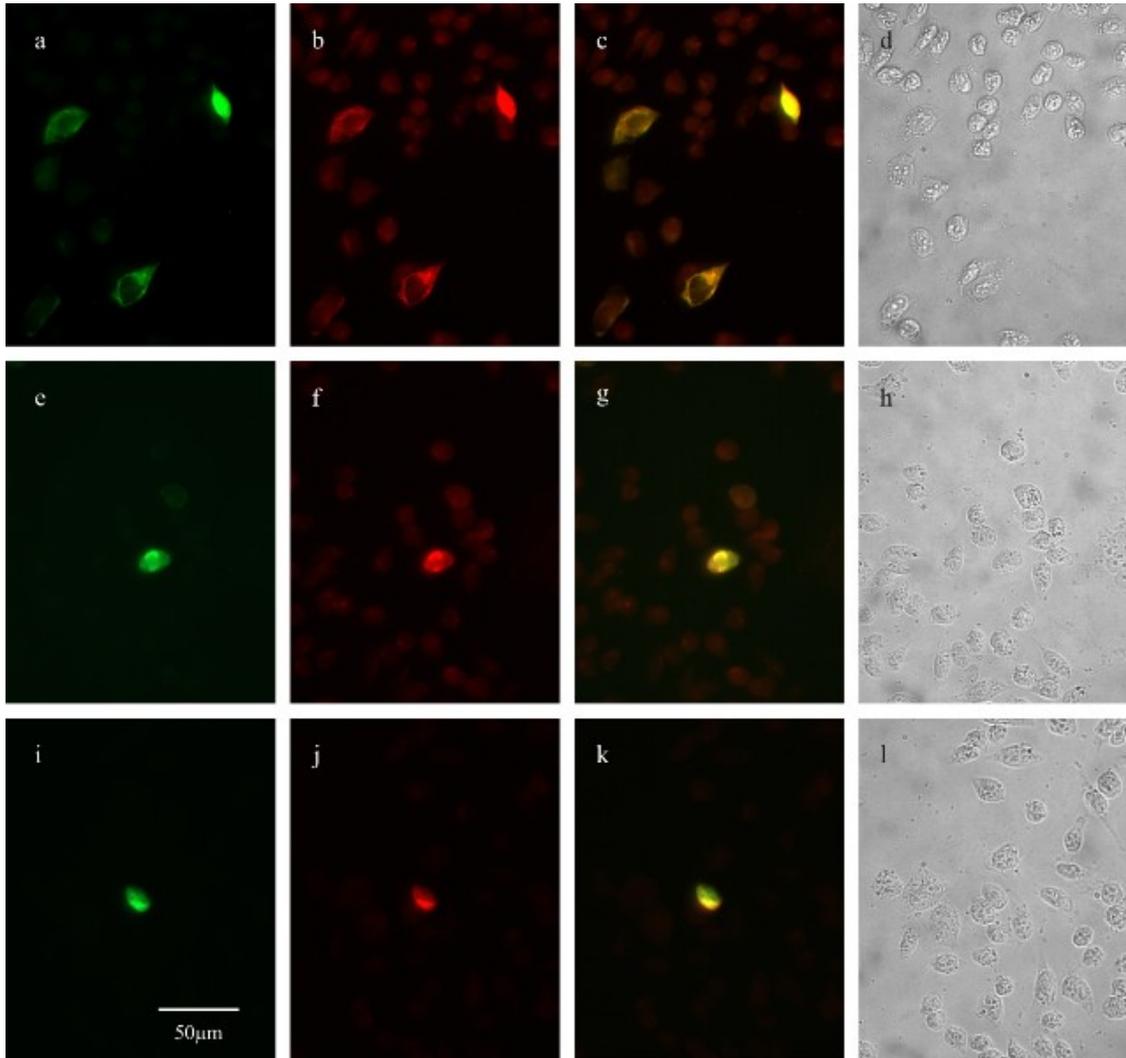


Abb. 19: Aufnahmen der Ergebnisse von CHO-Zellen, die mit pcDNA3.1/erg3/EGFP transfiziert und mit dem TB1-AK (Eigenherstellung) gefärbt sind. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **e** und **i** zeigen die Expression des EGFPs, welches an die erg3-Kanaluntereinheit gekoppelt ist. Die roten Fluoreszenzen in **b**, **f** und **j** stellen die Markierungen mit den Antikörpern (primär und sekundär). **c**, **g** und **k** zeigen die Überlagerungen der Fluoreszenzen des EGFPs mit AK-Färbungen dar. In **d**, **h** und **l** sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen. Verdünnungen: **a-d**: 1:2000, **e-h**: 1:5000, **i-l**: 1:10000.

2.HEK-Zellen

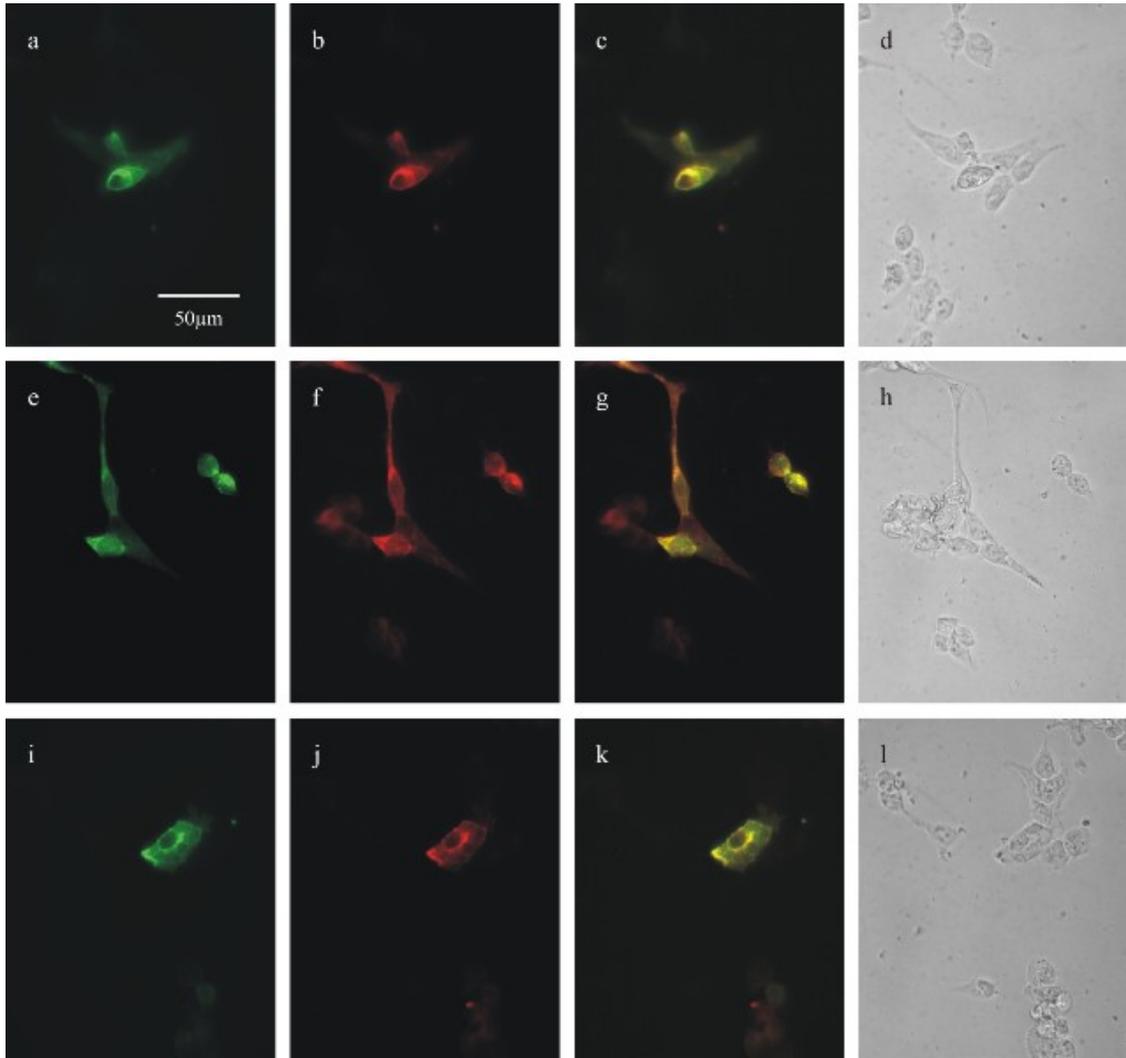


Abb. 20: Aufnahmen der Ergebnisse von HEK-Zellen, die mit pcDNA3.1/erg3/EGFP transfiziert und mit dem TB1-AK (Eigenherstellung) gefärbt sind. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **e** und **i** zeigen die Expression des EGFPs, welches an die erg3-Kanaluntereinheit gekoppelt ist. Die roten Fluoreszenzen in **b**, **f** und **j** zeigen die Markierungen mit den Antikörpern (primär und sekundär). **c**, **g** und **k** stellen Überlagerungen der Fluoreszenzen des EGFPs mit AK-Färbungen dar. In **d**, **h** und **l** sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen. Verdünnungen: **a-d**: 1:2000, **e-h**: 1:5000, **i-l**: 1:10000.

4.1.3.2 TB2-Antikörper (Eigenherstellung)

Dieser Antikörper erbrachte ähnliche Ergebnisse wie die des TB1, allerdings mit weniger Hintergrundfärbungen. Auch dieses Mal, ähnlich wie bei den Ergebnissen der Immunzytochemie mit dem TB1-AK, konnte bei ihnen eine fast perfekte 1:1-Deckungsgleichheit für rot:grün aufgezeigt werden. Aufnahmen der Ergebnisse zeigen **Abb. 21** und **22**.

pcDNA3.1/erg3/EGFP (tagged) transfizierte Zellen

1. CHO-Zellen

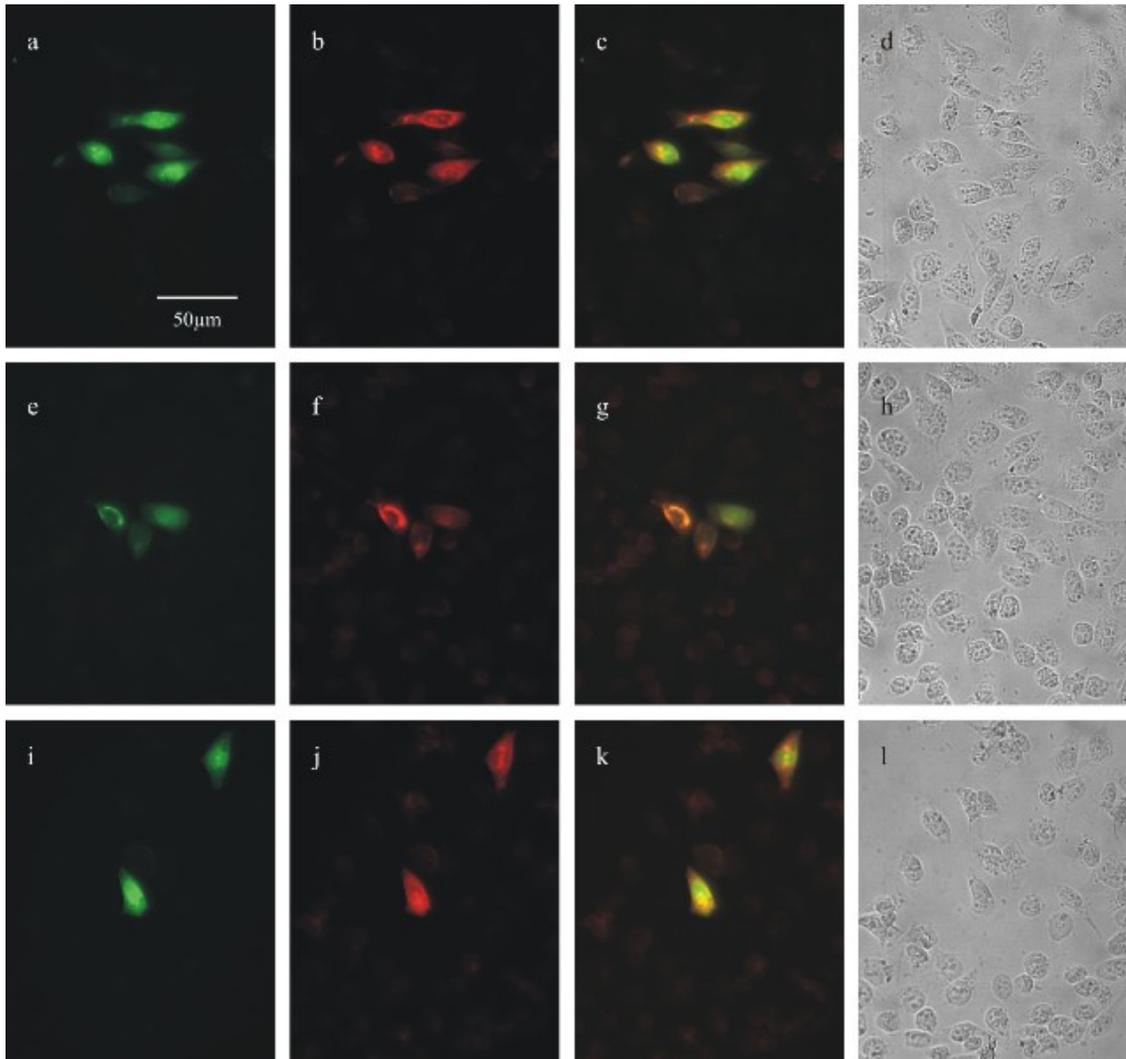
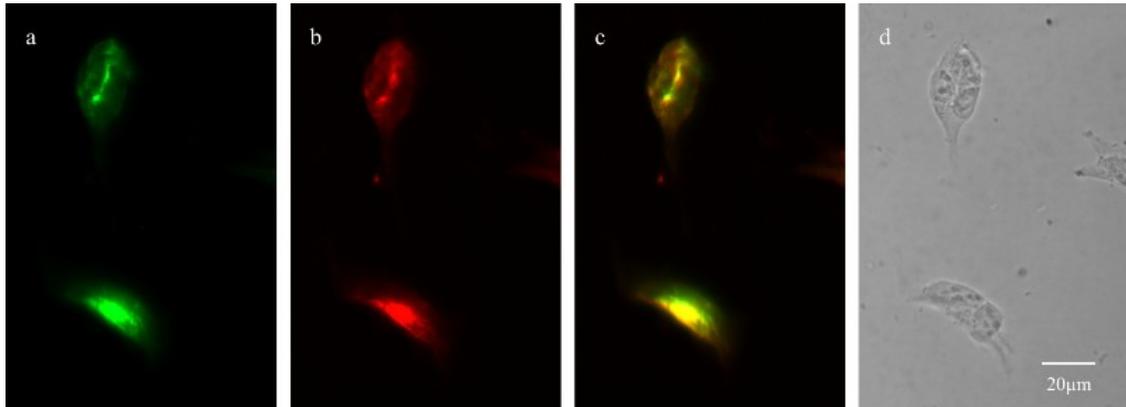
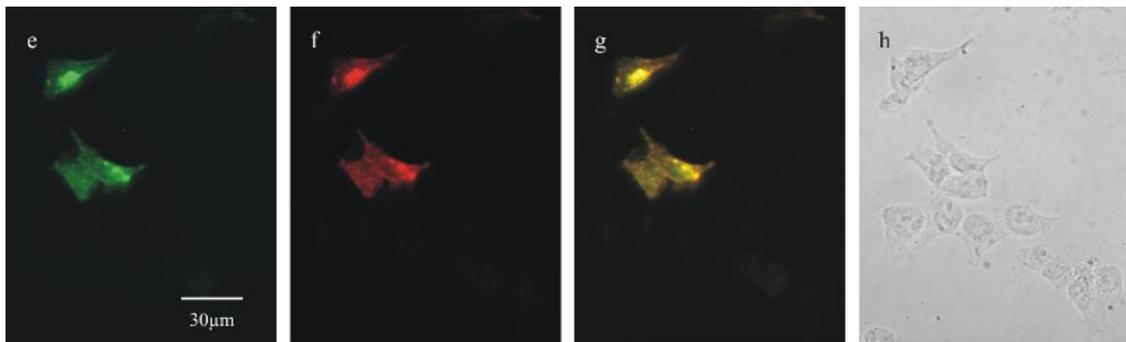


Abb. 21: Aufnahmen der Ergebnisse von CHO-Zellen, die mit pcDNA3.1/erg3/EGFP transfiziert und mit TB2 (Eigenherstellung) gefärbt sind. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **e** und **i** zeigen die Expression des EGFPs, welches an die erg3-Kanaluntereinheit gekoppelt ist. Die roten Fluoreszenzen in **b**, **f** und **j** zeigen die Markierungen mit den Antikörpern (primär und sekundär). **c**, **g** und **k** stellen die Überlagerungen der Fluoreszenzen des EGFPs mit AK-Färbungen dar. In **d**, **h** und **l** sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen. Verdünnungen: **a-d**: 1:2000, **e-h**: 1:5000, **i-l**: 1:10000.

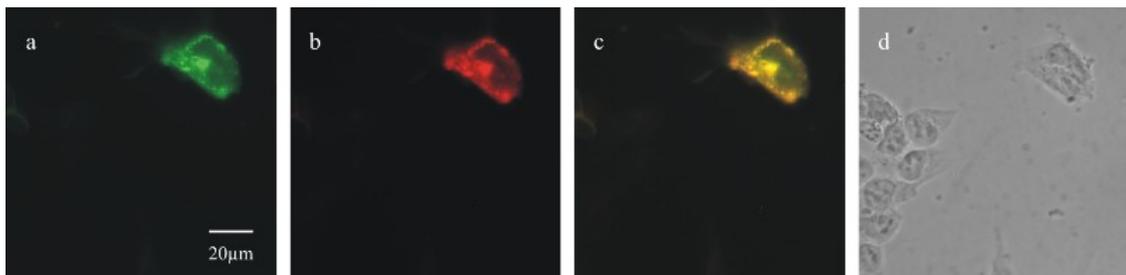
2. HEK-Zellen



I) Verd. 1:2000



II) Verd. 1:5000



III) Verd. 1:10000

Abb. 22: Aufnahmen der Ergebnisse von HEK-Zellen, die mit pcDNA3.1/erg3/EGFP transfiziert und mit TB2 (Eigenherstellung) gefärbt sind. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **e** und **i** zeigen die Expression des EGFPs, welches an die erg3-Kanaluntereinheit gekoppelt ist. Die roten Fluoreszenzen in **b**, **f** und **j** zeigen die Markierungen mit den Antikörpern (primär und sekundär). **c**, **g** und **k** stellen die Überlagerungen der Fluoreszenzen des EGFPs mit AK-Färbungen dar. In **d**, **h** und **l** sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen. Als SAK wurde der rote Alexa Fluor® 546 Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper, A-11010 (Molecular Probes) verwendet.

Ko-transfizierte Zellen, mit pcDNA3/EGFP und pcDNA3/erg3 (untagged)

Wenn die Antikörper TB1 und TB2 miteinander verglichen werden, kann man erkennen, dass die immunzytochemischen Ergebnisse des TB2 die des TB1 leicht übertrafen. Aus diesem Grunde wurde er für die Immunzytochemie der pcDNA3.1/erg3 und pcDNA3/EGFP ko-transfizierten Zellen ausgewählt. Fotos der Ergebnisse der ICC ohne tag zeigt **Abb. 23**.

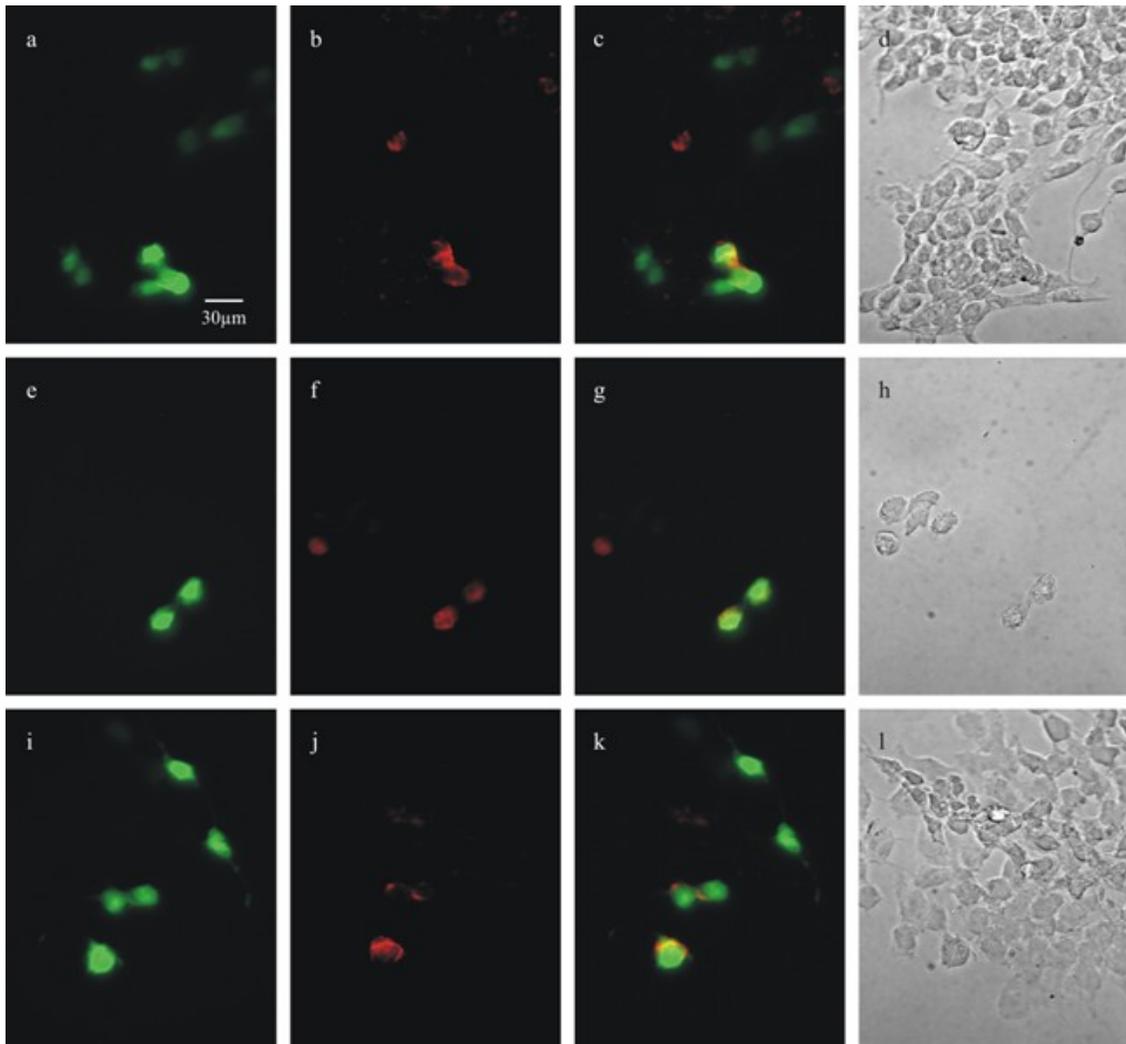


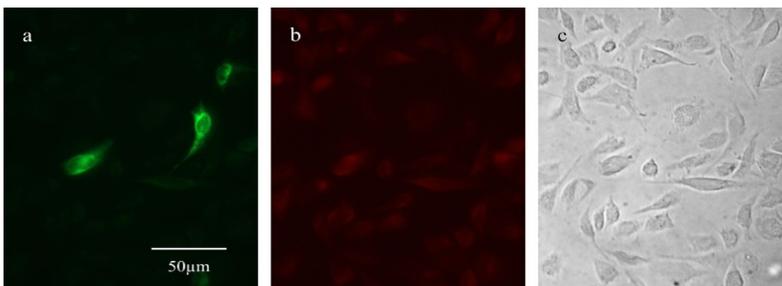
Abb.23: Aufnahmen von HEK-Zellen, die separat mit pcDNA3.1/erg3 und pcDNA3/EGFP transfiziert und mit TB2 (Eigenherstellung) gefärbt sind. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **e** und **i** zeigen die Expression des EGFPs. Die roten Fluoreszenzen in **b**, **f** und **j** zeigen die Markierungen der erg3-Untereinheiten mit den Antikörpern (primär und sekundär). **c**, **g** und **k** stellen die Überlagerungen der Fluoreszenzen der erg3-Kanaluntereinheiten mit AK-Färbungen dar. In **d**, **h** und **l** sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen. Verdünnungen: **a-d**: 1:1000, **e-h**: 1:5000, **i-l**: 1:10000.

4.1.4 Kreuzreaktionen

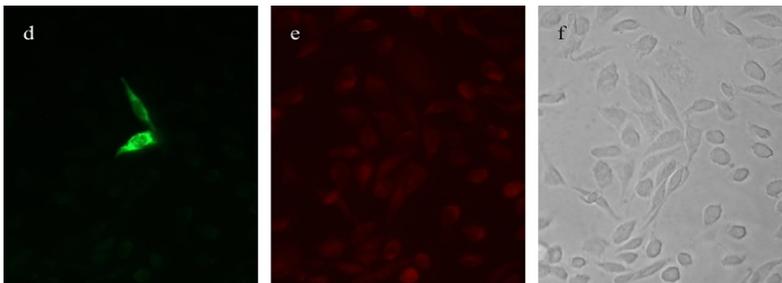
Transfektion mit pcDNA3.1/erg1/EGFP

CHO Zellen wurden mit pcDNA3.1/erg1/EGFP transfiziert. Diese wurden dann mit den Antikörpern CR1, CR2 und Anti-K_v 11.2 (erg2), #APC114 (Alomone Labs) gefärbt, welche alle gegen erg2 gerichtet sind. Bei den Ergebnissen wurde keine rote Fluoreszenz erzeugt (**Abb. 24**). Dies ist hinweisend darauf, dass keine Markierungen der erg1-Untereinheiten mit den entsprechenden Antikörpern stattgefunden haben.

I) ICC mit CR1 (Eigenherstellung), Verd. 1:10000



II) ICC mit CR2 (Eigenherstellung); Verd. 1:10000



III) ICC mit Anti-K_v 11.2 (erg2) Antikörper, #APC114 (Alomone Labs), Verd. 1:5000

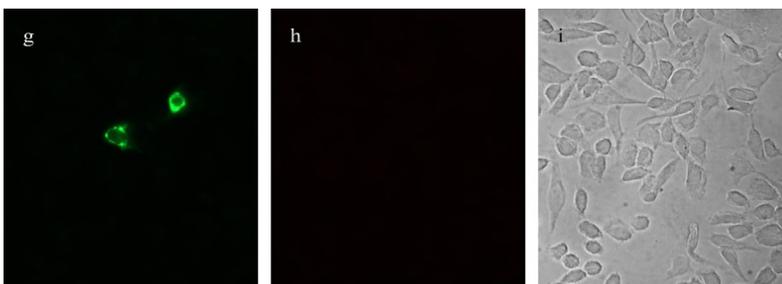


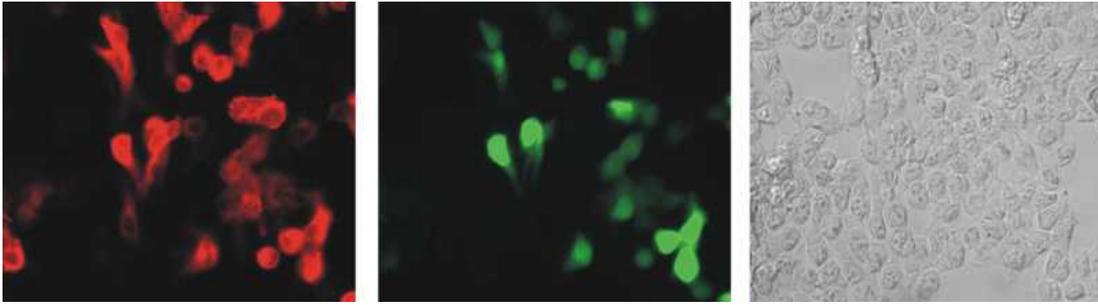
Abb. 24: Aufnahmen der Kreuzreaktionen von CHO-Zellen, die mit pcDNA3.1/erg1/EGFP transfiziert sind. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **d** und **g** zeigen die Expression des EGFPs, welches an die erg1-Kaliumkanaluntereinheit gekoppelt ist. In **b**, **e** und **h** wird keine rote Fluoreszenz erzeugt. In **c**, **f** und **i** sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen.

Im Labor des Instituts für Angewandte Physiologie wurden zusätzlich weitere Kreuzreaktionen durchgeführt. Hierfür wurden CHO-Zellen eingesetzt, welche mit entsprechenden *untagged* Vektoren kodierend für die einzelnen erg-Kaliumkanaluntereinheiten zuvor transfiziert wurden. Verschiedene Antikörper wurden wie folgt eingesetzt.

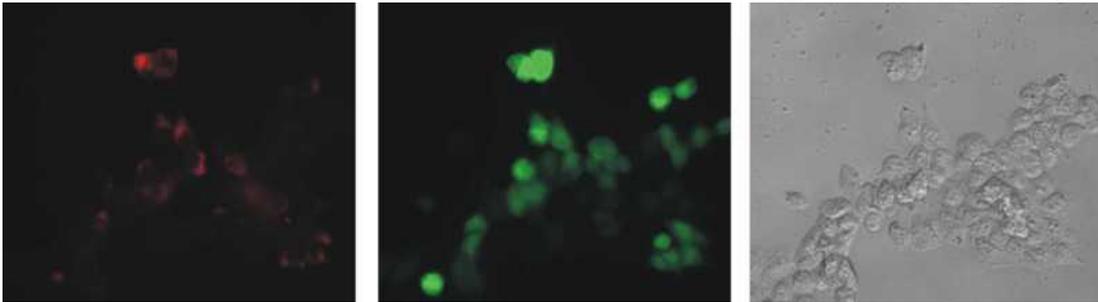
ICC mit Anti-hK_v 11.1 (HERG) Antikörper, #APC062 (Alomone Labs)

Ergebnisse dieser Färbungen sind in Abb. 25 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass dieser AK die erg1-Kanaluntereinheit erkannt hatte (**Abb. 25a**). An den erg2-Untereinheiten zeigten sich ebenfalls Immunreaktionen, deren Färbeintensitäten jedoch nicht so überzeugend waren wie bei den erg1-Kanaluntereinheiten (**Abb. 25b**). erg3-Kanaluntereinheiten wurden von diesem Antikörper nicht erkannt. Hier zeigte sich bei den Ergebnissen keine Fluoreszenz in rot (**Abb.25c**).

a)



b)



c)

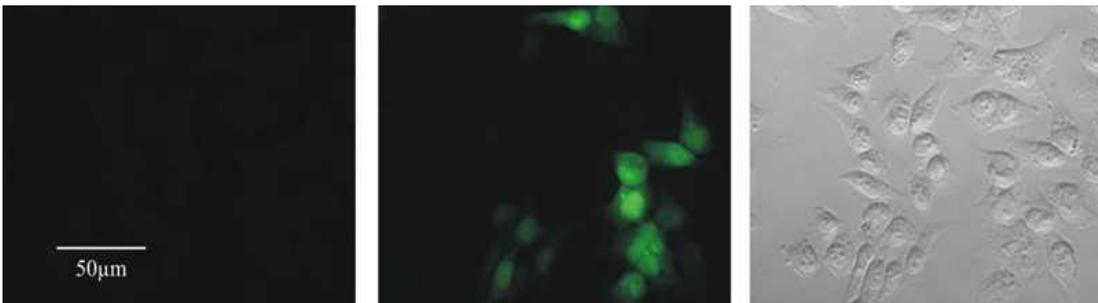
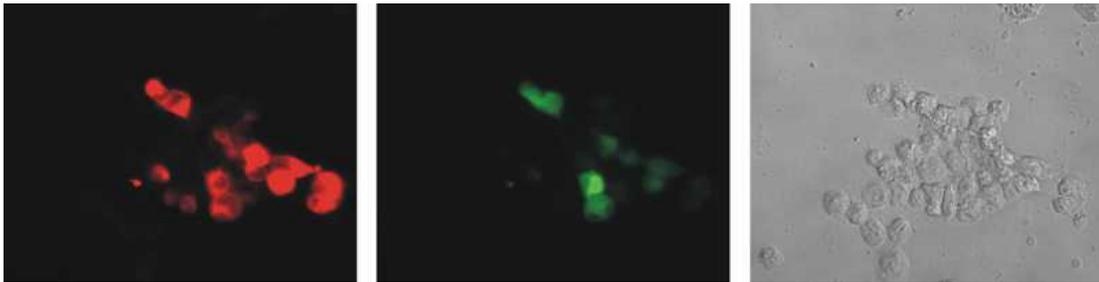


Abb. 25: Aufnahmen der Kreuzreaktionen von CHO-Zellen, jeweils zuvor mit *untagged* Plasmiden pcDNA3.1/erg1 (a), pcDNA3.1/erg2 (b) und pcDNA3.1/erg3 (c) transfiziert. ICC wurde mit dem AK #APC062 (Alomone Labs) durchgeführt. Die grünen Fluoreszenzen zeigen die Expression des EGFPs. Die roten Fluoreszenzen zeigen die Markierungen der erg-Untereinheiten mit den Antikörpern (primär und sekundär). Rechts (in grau) sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen.

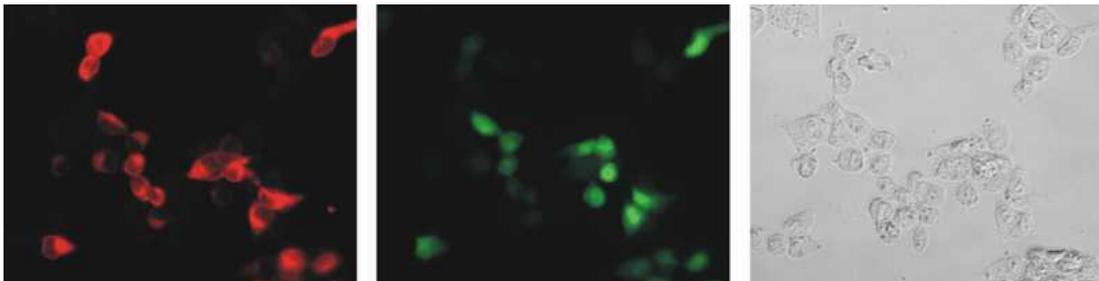
ICC mit CR1 (Eigenherstellung)

Dieser Antikörper setzte an *erg1*- (**Abb. 26a**) und auch an *erg2*-Kaliumkanaluntereinheiten (**Abb. 26b**) an. Jedoch zeigte sich, dass bei dem Versuch des letzteren eine schwächere Immunreaktion stattgefunden hat. *erg3*-Untereinheiten wurden von den CR1-AK nicht erkannt (**Abb. 26c**).

a)



b)



c)

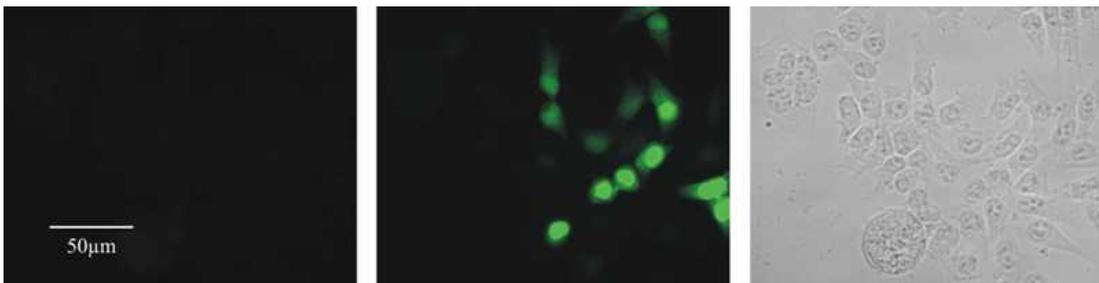
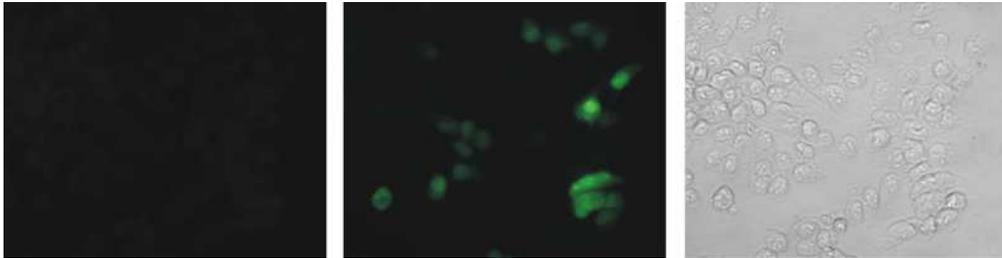


Abb. 26: Aufnahmen der Kreuzreaktionen von CHO-Zellen, jeweils zuvor mit *untagged* Plasmiden pcDNA3.1/*erg1* (a), pcDNA3.1/*erg2* (b) und pcDNA3.1/*erg3* (c) transfiziert. ICC wurde mit CR1 (aus Eigenherstellung) durchgeführt. Die grünen Fluoreszenzen zeigen die Expression des EGFPs. Die roten Fluoreszenzen zeigen die Markierungen der *erg*-Untereinheiten mit den Antikörpern (primär und sekundär). Rechts (in grau) sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen.

ICC mit CR2 (Eigenherstellung)

Bei diesem Versuch konnte dargestellt werden, dass dieser Antikörper die *erg1*- und *erg3*-Kanaluntereinheiten nicht erkennen konnte (**Abb. 27 a und b**).

a)



b)

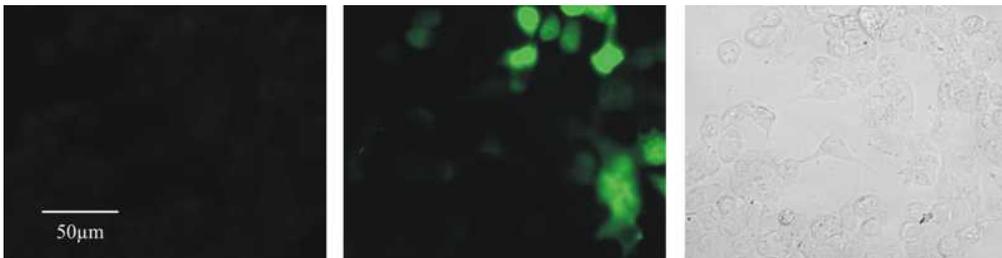
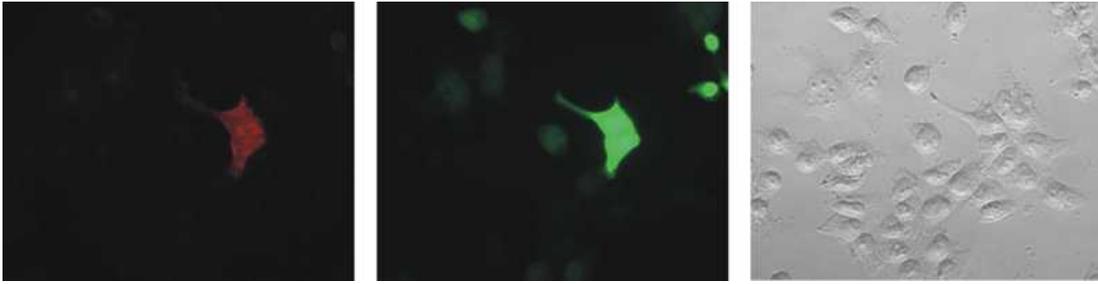


Abb. 27: Aufnahmen der Kreuzreaktionen von CHO-Zellen, jeweils zuvor mit *untagged* Plasmiden *pcDNA3.1/erg1* (a) und *pcDNA3.1/erg3* (b) transfiziert. ICC wurde mit CR2 (aus Eigenherstellung) durchgeführt. Die grünen Fluoreszenzen in a, e und i zeigen die Expression des EGFPs. Die roten Fluoreszenzen zeigen die Markierungen der *erg*-Untereinheiten mit den Antikörpern (primär und sekundär). Rechts (in grau) sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen.

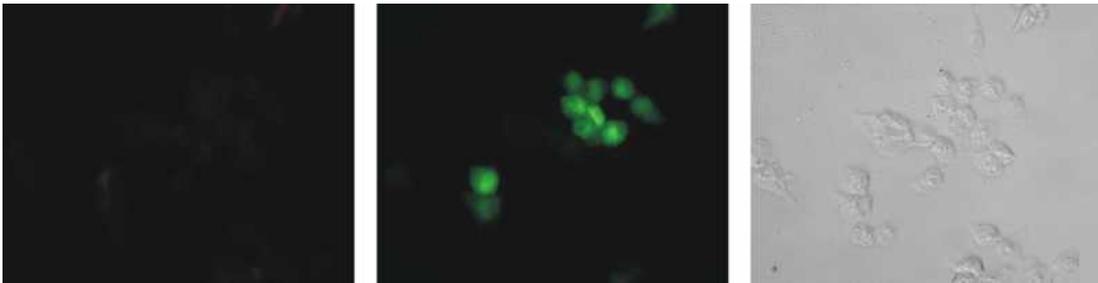
ICC mit TB1 und TB2 (Eigenherstellung)

Beide Antikörper zeigten eine positive Immunreaktion beim Nachweis von *erg3*-Kanaluntereinheiten (**Abb. 28a** und **Abb. 29a**). Bei dem Erkennen der Untereinheiten *erg1* und *erg2* konnten keine roten Fluoreszenzen erzeugt werden. Eine Immunreaktion fand hier nicht statt (**Abb. 28 b-c** und **Abb. 29 b-c**).

a)



b)



c)

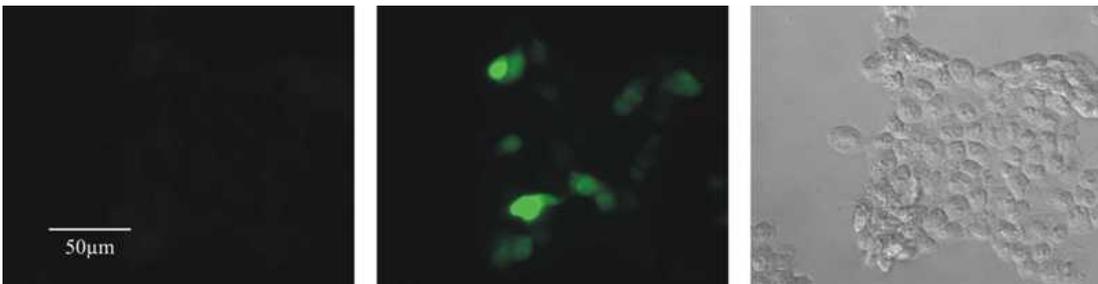
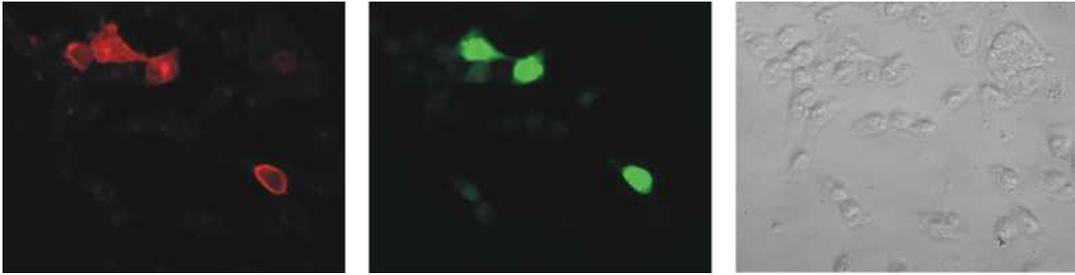
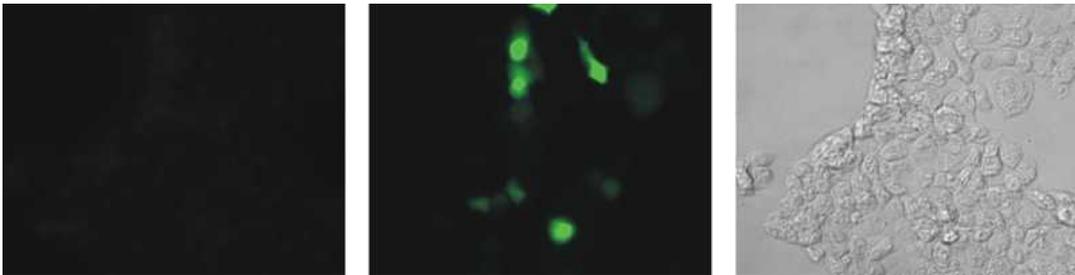


Abb. 28: Aufnahmen der Kreuzreaktionen von CHO-Zellen, jeweils zuvor mit *untagged* Plasmiden pcDNA3.1/erg3 (a), pcDNA3.1/erg1 (b) und pcDNA3.1/erg2 (c) transfiziert. ICC wurde mit TB1 (aus Eigenherstellung) durchgeführt. Die grünen Fluoreszenzen in a, e und i zeigen die Expression des EGFPs. Die roten Fluoreszenzen zeigen die Markierungen der erg-Untereinheiten mit den Antikörpern (primär und sekundär). Rechts (in grau) sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen.

a)



b)



c)

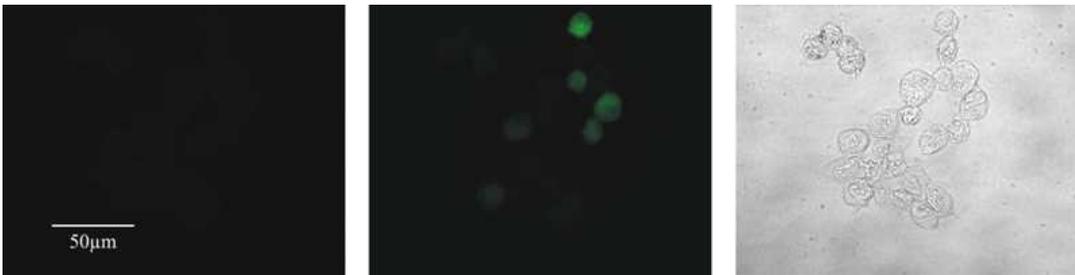


Abb. 29: Aufnahmen der Kreuzreaktionen von CHO-Zellen, jeweils zuvor mit *untagged* Plasmiden pcDNA3.1/erg3 (**a**), pcDNA3.1/erg1 (**b**) und pcDNA3.1/erg2 (**c**) transfiziert. ICC wurde mit TB2 (aus Eigenherstellung) durchgeführt. Die grünen Fluoreszenzen in **a**, **e** und **i** zeigen die Expression des EGFPs. Die roten Fluoreszenzen zeigen die Markierungen der erg-Untereinheiten mit den Antikörpern (primär und sekundär). Rechts (in grau) sind die Zellen in Nativaufnahmen zu sehen.

4.2 Immunzytochemie des Nativen Gewebes (Bulbus olfactorius)

Bei diesen immunzytochemischen Versuchen wurden Doppelfärbungen mit zwei verschiedenen Antikörpern an Zellen des Bulbus olfactorius durchgeführt:

Der Antikörper gegen metabotrope Glutamatrezeptoren vom Subtyp 1 (Novus Biologicals) wurde verwendet, um die Mitralzellen im Bulbus olfactorius zu identifizieren. Diese Zellen weisen reichlich mGluR1 an ihrer Oberfläche auf (Guasti et al., 2005; Papa et al., 2003; Saganich et al., 2001). Der mGluR1-AK wurde stets mit einer Verdünnung von 1:1 000 eingesetzt. Immunreaktionen fluoreszierten in den nachfolgenden Abbildungen rot.

Zur Darstellung der Kaliumkanäle wurde für jede Untereinheit derjenige Antikörper ausgewählt, der in der Immunzytochemie heterologer Expressionssysteme, in Bezug zur Ko-Lokalisation der roten und grünen Fluoreszenzen, die besten Ergebnisse hervorbrachte. Immunreaktionen fluoreszierten entsprechend grün. Die einzelnen Antikörper wurden in jedem Versuch in zwei verschiedenen Verdünnungen eingesetzt (s. Bildlegenden **30-35**). Die ausgewählten Verdünnungen wurden zuvor in der Immunzytochemie der heterologen Expressionssysteme titriert. Diese entsprachen 1:400 und 1:1 000 bei dem Anti-hK_v 11.1 (HERG) Antikörper, #APC062 (Alomone Labs). Für die Immunzytochemie mit den Primärantikörpern CR1 und TB2 (aus Eigenproduktion) hatten sich optimale Ergebnisse bei viel stärkeren Verdünnungen, 1:5 000 und 1:10 000 erwiesen. Diese wurden entsprechend bei der Immunzytochemie des nativen Gewebes eingesetzt.

Die Doppelfärbungen wurden jeweils mit einer Carrierlösung höherer Konzentration des bovinen Serumalbumin (BSA) wiederholt. Mit diesen Versuchen sollte überprüft werden, ob Hintergrundfärbungen vermieden werden konnten. In diesen Versuchen wurde anstatt der üblichen 0,2%-haltigen Carrierlösung eine 1%-haltige Carrierlösung eingesetzt.

Ergebnisse der gesamten Immunzytochemie des nativen Gewebes werden in den folgenden Abbildungen **30** bis **35** gezeigt. Generell zeigten sich in den Ergebnissen der einzelnen immunzytochemischen Versuche nur schwache Fluoreszenzsignale der Immunreaktion der eingesetzten Antikörper. Aufgrund dessen sind die folgenden Aufnahmen bei einer sehr hohen Belichtungszeit angefertigt worden. Dies traf insbesondere für die Kaliumkanaluntereinheit *erg3* zu. Auf mögliche Ursachen diesbezüglich wird in der Diskussion nochmals ausführlich eingegangen.

4.2.1 Darstellung der erg1-Kaliumkanaluntereinheit

ICC mit Anti-hK_v 11.1 (HERG) Antikörper, #APC062 (Alomone Labs)

0,2%BSA-haltiger Carrier

Ergebnisse dieses Versuchs zeigt **Abb. 30**. In **b** und **f** können die Mitralzellen durch ihre prominenten Somata und ihre langen Ausläufer erkannt werden. Fluoreszenzen der einzelnen markierten erg1-Kanaluntereinheiten sind innerhalb der Mitralzellen zu sehen. Die Zellmembranen waren komplett von dieser Immunreaktion ausgespart, was in den Überlagerungsaufnahmen (**c** und **g**) verdeutlicht wird. Ein subzelluläres Verteilungsmuster innerhalb der Zellen war nicht zu erkennen.

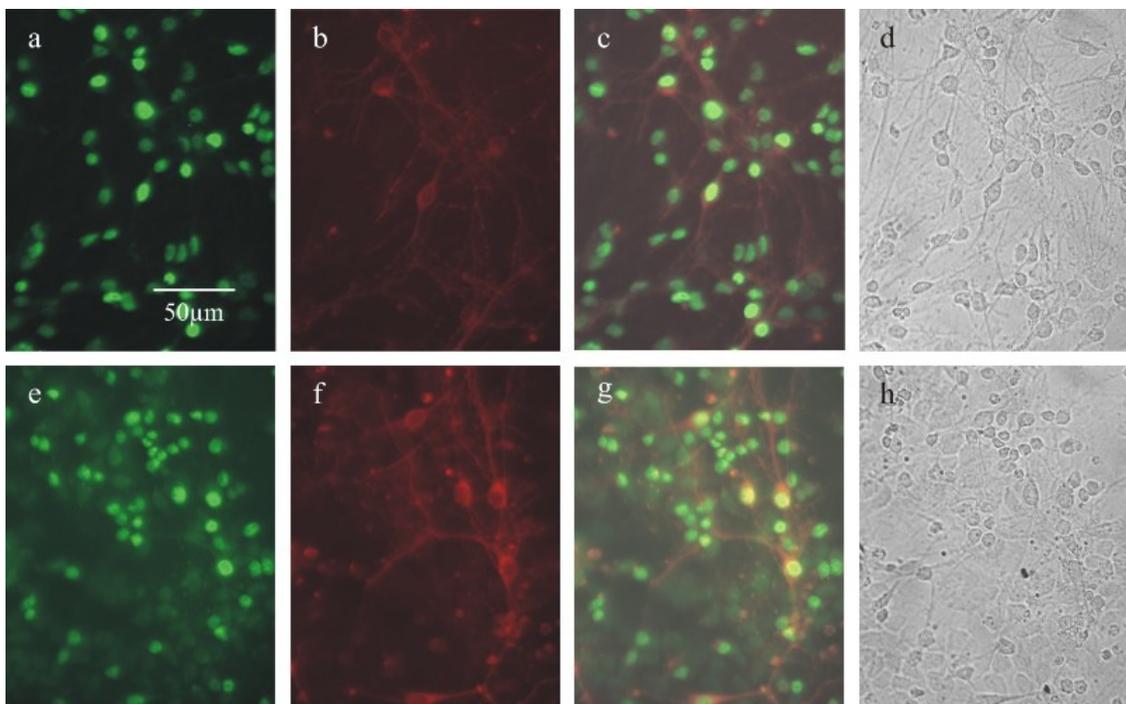


Abb. 30: Aufnahmen von Zellen des Bulbus olfactorius am Mikroskop. Die grünen Fluoreszenzen in **a** und **e** zeigen die Markierungen der erg1-Kanaluntereinheiten mit dem Anti-hK_v 11.1 (HERG) Antikörper, #APC062 (Alomone Labs). Die roten Fluoreszenzen in **b** und **f** zeigen die Immunreaktionen des mGluR1-AKs. In **c** und **g** sind die Überlagerungen der Fluoreszenzen erg1-Kanaluntereinheiten und die der mGluR1 zu sehen. **d** und **h** stellen die Nativaufnahmen dar. **a-d** zeigen jeweils die Ergebnisse bei einer Verdünnung von 1:400. In **e-h** sind die Ergebnisse bei einer Verdünnung von 1:1000 des erg1-AKs dargestellt.

1% BSA-haltiger Carrier

Dieser Versuch wurde analog zu dem Versuch der eingesetzten 0,2% BSA-haltigen Carrierlösung durchgeführt. Ein Unterschied der Ergebnisse zwischen diesem und dem vorausgegangenem Versuch mit dem niedrigerem BSA-haltigem Carrier konnte mikroskopisch nicht erkannt werden. Ergebnisse konnten somit optisch, insbesondere bezüglich der Hintergrundfärbung, nicht verbessert werden. Fluoreszenzintensitäten, speziell die der Immunreaktionen der mGluR1 zeigten sich schwach, wie in der nächsten Abbildung hervorgehoben.

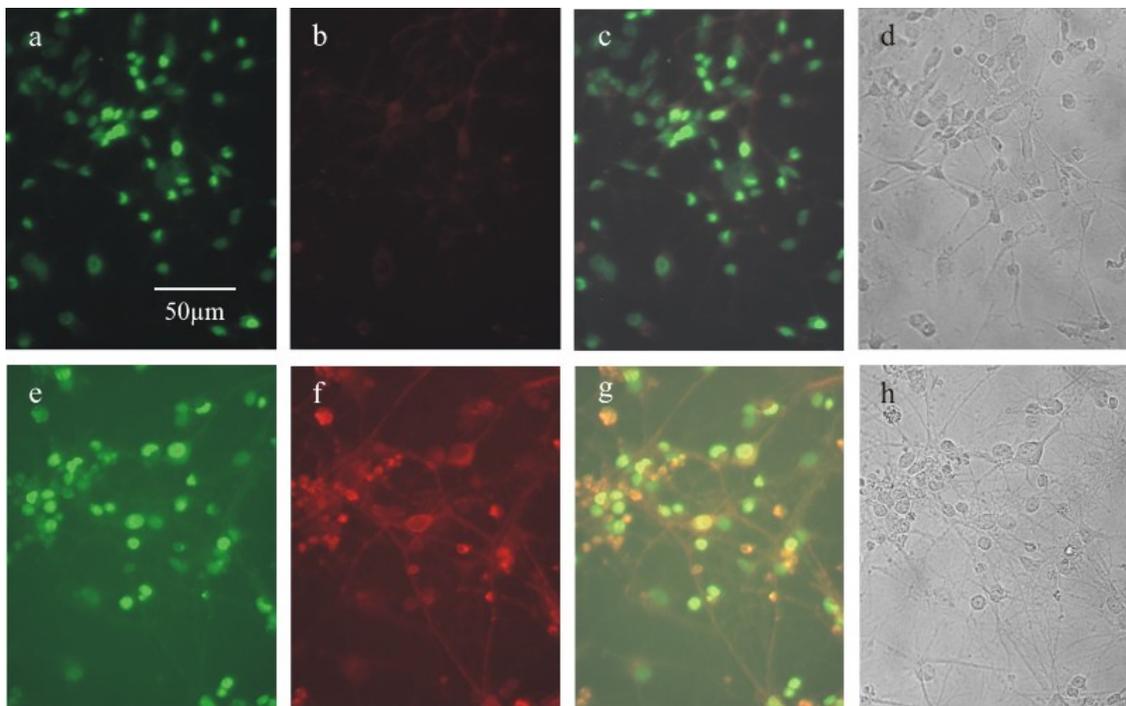


Abb. 31: Aufnahmen der M/T-Zellen bei 1%-haltiger Carrierlösung. Die grünen Fluoreszenzen in **a** und **e** zeigen die Markierungen der erg1-Kanaluntereinheiten mit dem Anti-hK_v 11.1 (HERG) Antikörper, #APC062 (Alomone Labs). Die roten Fluoreszenzen in **b** und **f** stellen die Immunreaktion des mGluR1-AKs dar. **c** und **g** zeigen die Überlagerungen der Fluoreszenzen der erg1 und die der mGluR1. In **d** und **h** stellen Nativaufnahmen dar.

a-d zeigen jeweils die Ergebnisse bei einer Verdünnung von 1:400. Hier wurden die Aufnahmen bei einer sehr kurzen Belichtungszeit angefertigt. In **e-h** sind die Ergebnisse bei einer Verdünnung von 1:1000 des erg1-AKs zu sehen.

4.2.2 Darstellung der erg2-Kanaluntereinheit

ICC mit CR1 (Eigenproduktion)

Dieser Antikörper erkannte nur sehr schwach die entsprechenden Epitope der erg2-Kanaluntereinheiten in den Mitralzellen des Bulbus olfactorius. Die Erhöhung des BSA in der verwendeten Carrierlösung brachte keine wesentliche Verbesserung hervor. Jedoch konnten in diesem Versuch Hintergrundfärbungen unspezifischer Proteine etwas vermieden werden. Entsprechende Ergebnisse stellen die **Abb. 32** und **33** dar.

0,2% BSA-haltiger Carrier

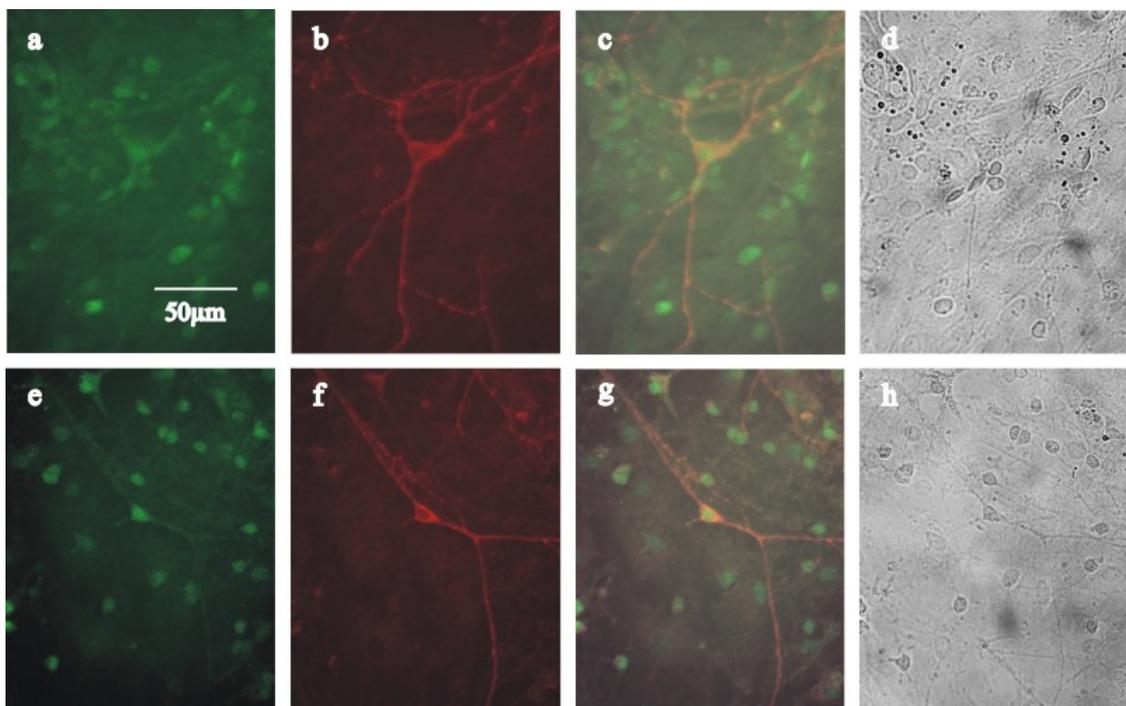


Abb. 32: Aufnahmen von Zellen des Bulbus olfactorius am Mikroskop. Die grünen Fluoreszenzen in **a** und **e** zeigen die Markierungen der erg2-Kanaluntereinheiten mit dem CR1-AK. Die roten Fluoreszenzen in **b** und **f** stellen die Immunreaktion des mGluR1-AKs dar. **c** und **g** zeigen die Überlagerungen der Fluoreszenzen der erg2-Untereinheiten und die der mGluR1. In **d** und **h** Nativaufnahmen zu sehen. **a-d** zeigen jeweils die Ergebnisse bei einer Verdünnung von 1:5000. In **e-h** sind die Ergebnisse bei einer Verdünnung von 1:10000 des erg2-AKs zu sehen.

1% BSA-haltiger Carrier

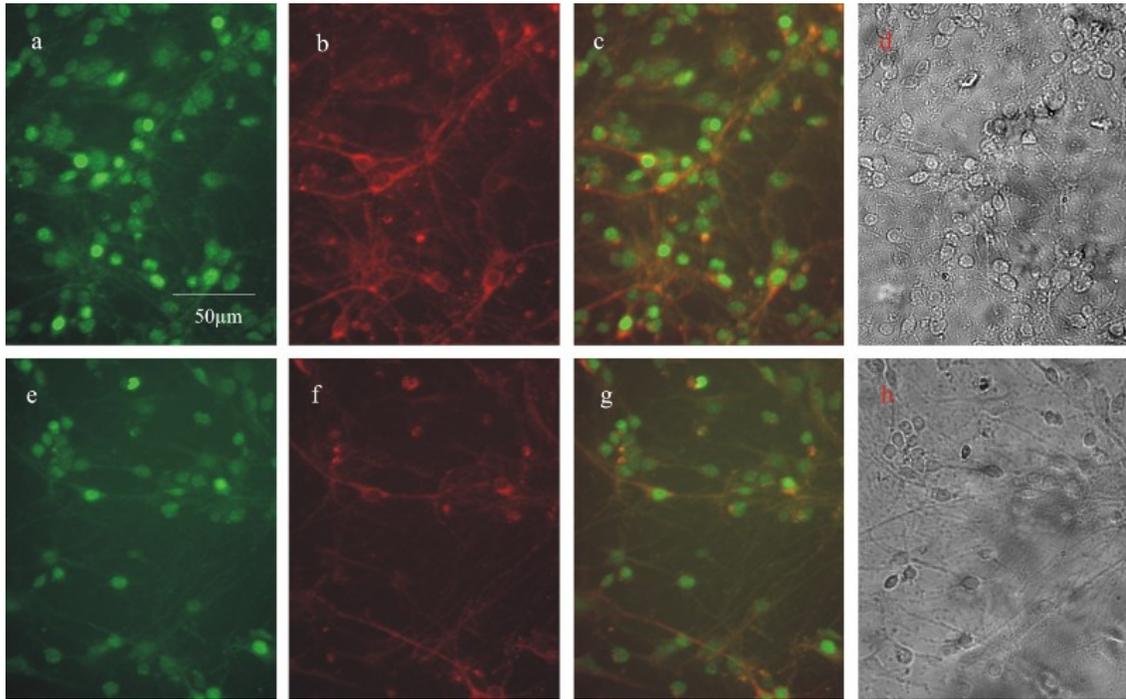


Abb. 33: Aufnahmen der Zellen des Bulbus olfactorius bei 1% BSA-haltiger Carrierlösung. Die grünen Fluoreszenzen in **a** und **e** zeigen die Markierungen der erg2-Kanaluntereinheiten mit dem CR1-AK. Die roten Fluoreszenzen in **b** und **f** stellen die Immunreaktionen des mGluR1-AKs dar. **c** und **g** zeigen die Überlagerungen der Fluoreszenzen der erg2-Kanaluntereinheiten und die der mGluR1. In **d** und **h** sind Nativaufnahmen zu sehen. **a-d** zeigen jeweils die Ergebnisse bei einer Verdünnung von 1:5000. In **e-h** sind die Ergebnisse bei einer Verdünnung von 1:10000 des erg2-AKs zu sehen.

Weiterhin konnte man deutlich in den Überlagerungsaufnahmen die Aussparungen der Zellmembranen der Mitralzellen erkennen. Dies spricht dafür, dass sich die Kanäle intrazellulär befinden könnten, vor allem an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und denen des Golgi Apparates.

4.2.3 Darstellung der erg3-Kanaluntereinheit

ICC mit TB2

Ergebnisse immunzytochemischer Färbungen mit diesem Antikörper, um eventuell in den Mitralzellen vorhandene erg3-Kanaluntereinheiten nachzuweisen, zeigten sehr schwache Immunreaktionen. Diese konnten durch die Erhöhung der BSA-Konzentration in einem weiteren Versuch nicht wesentlich verstärkt werden. Aufnahmen der Ergebnisse dieser beiden Versuche sind in **Abb. 34** bzw. in **Abb. 35** dargestellt.

0,2% BSA-haltiger Carrier

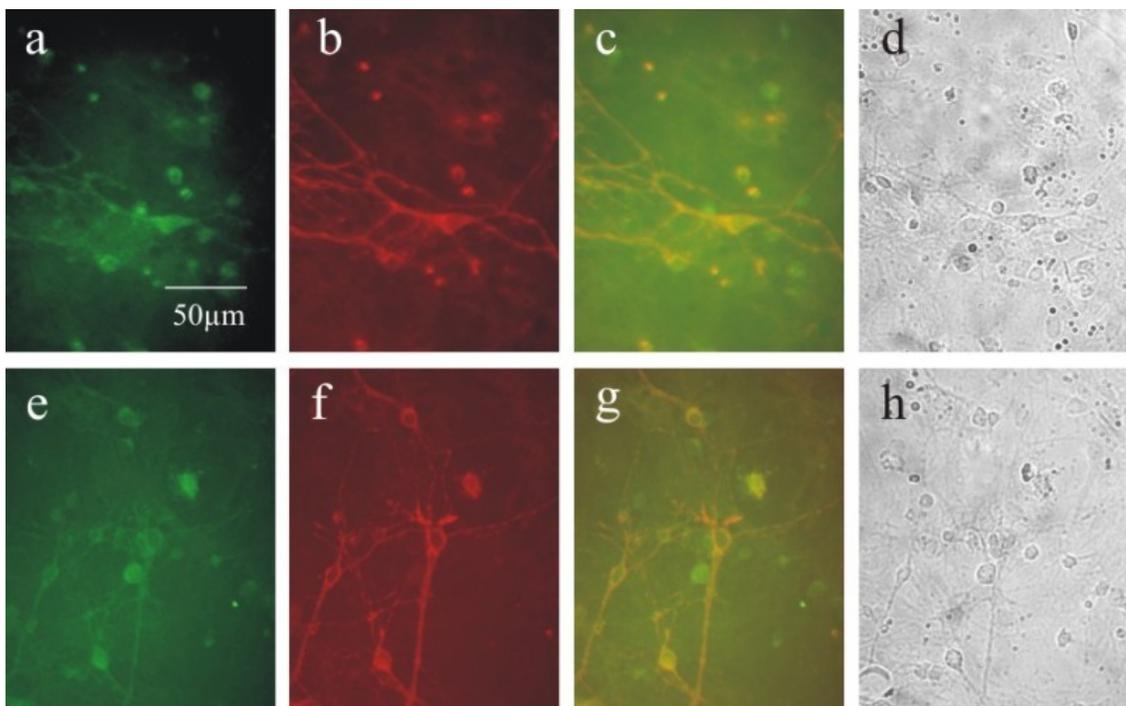


Abb. 34: Aufnahmen von Zellen des Bulbus olfactorius am Mikroskop. Die grünen Fluoreszenzen in **a** und **e** zeigen die Markierungen der erg3-Kanaluntereinheiten mit dem TB2-AK. Die roten Fluoreszenzen in **b** und **f** stellen die Immunreaktion des mGluR1-AKs dar. **c** und **g** zeigen die Überlagerungen der erg3-Untereinheiten und die der mGluR1. In **d** und **h** sind die Nativaufnahmen zu sehen. **a-d** zeigen jeweils die Ergebnisse bei einer Verdünnung von 1:5000. In **e-h** sind die Ergebnisse bei einer Verdünnung von 1:10000 des erg3-AKs dargestellt.

1 % BSA-haltiger Carrier

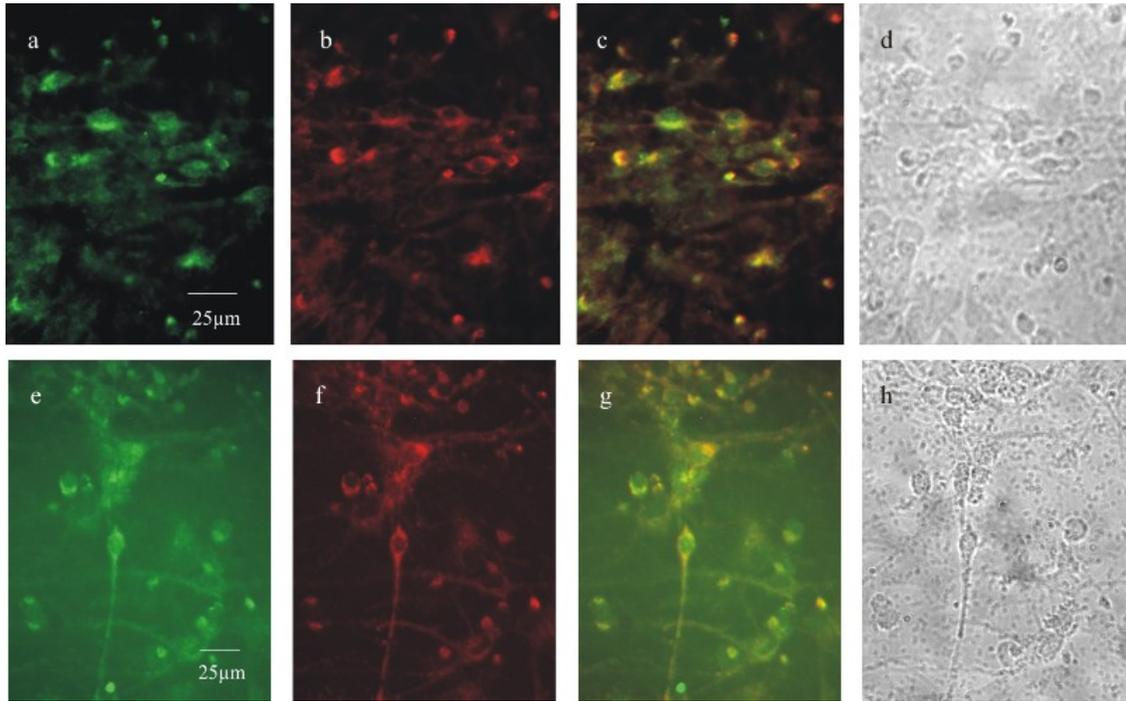


Abb. 35: Aufnahmen von Zellen des Bulbus olfactorius bei 1% BSA-haltiger Carrierlösung am Mikroskop. Die grünen Fluoreszenzen in **a** und **e** zeigen die Markierungen der erg3-Kanaluntereinheiten mit dem TB2-AK. Die roten Fluoreszenzen in **b** und **f** stellen die Immunreaktion des mGluR1-AKs dar. **c** und **g** zeigen die Überlagerungen der Fluoreszenzen der erg3-Kanaluntereinheiten und die der mGluR1. In **d** und **h** sind Nativaufnahmen zu sehen. **a-d** zeigen jeweils die Ergebnisse bei einer Verdünnung von 1:5000. In **e-h** sind die Ergebnisse bei einer Verdünnung von 1:10000 des erg3-AKs dargestellt.

Nur sporadische Fluoreszenzmarkierungen der Kanaluntereinheiten konnten gesehen werden. Dennoch konnte in diesen Versuchen ein subzelluläres Verteilungsmuster dieser Kanaluntereinheiten innerhalb der Mitralzellen gezeigt werden, wie in den **Abb. 34 a** und **e** sowie in **Abb. 35 a** und **e** zu sehen ist. Die sporadisch erzeugten grünen Fluoreszenzen sah man diesmal nicht nur intrazellulär, sondern auch an den Zellmembranen der Mitralzellen.

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung und Zweck der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Antikörper gegen die Kaliumkanaluntereinheiten *erg1*, *erg2* und *erg3* durch immunzytochemische Färbungen getestet. In den einzelnen Versuchen der heterologen Expressionssysteme wurden Zellen zuvor mit pcDNA3.1 Vektoren (Invitrogen) transfiziert. In diesen befand sich inklonierte cDNA. Hier wurde mit zwei verschiedenen Ansätzen gearbeitet, d.h. die Plasmide waren entweder an EGFP gekoppelt (*tagged*), oder sie lagen in eigenständiger Form vor, ohne die EGFP-Koppelung (*untagged*).

Das Ziel war, herauszufinden, ob sich die Antikörper für den Nachweis von einzelnen *erg*-Kaliumkanaluntereinheiten eignen. Gegen die *erg1*-Kanaluntereinheit wurden drei kommerzielle polyklonale Antikörper getestet. Zwei hiervon, #APC016 Anti-K_v 11.1 (*erg1*) und #APC062 Anti-hK_v 11.1 (HERG), wurden von Alomone Labs hergestellt. Ein weiterer von Santa Cruz Biotechnology, sc-20130 Anti-HERG (H175) IgG Antikörper, wurde ebenfalls für diese Testung eingesetzt. Für die erhoffte Darstellung der *erg2*-Kanaluntereinheit wurde ein kommerziell erworbener Antikörper von Alomone Labs, #APC114 Anti-K_v 11.2 (*erg2*), und zwei Antikörper (CR1 und CR2, aus eigener Produktion im Labor des Instituts für Angewandte Physiologie) verwendet. Mit zwei weiteren Antikörpern aus eigener Herstellung, TB1 und TB2, wurde versucht, die Kanaluntereinheit *erg3* darzustellen.

Eingesetzte Antikörper, gegen die gleiche Kanaluntereinheit getestet, waren polyklonal. Dies bedeutet, dass diese an mehreren Epitopen am C-Terminus der *erg*-Kanalstruktur ansetzen könnten. Ein exakt lokalisierter Ansatzpunkt der Antikörper an den Antigenen in der *erg*-Aminosäuresequenz ist nicht bekannt.

Die Kanaluntereinheiten erg1-3 waren bereits 1997 nachgewiesen worden (Shi et al.). Die am meisten von ihnen untersuchte Untereinheit, nämlich erg1, ist im Zentralnervensystem sowie auch in mehreren peripheren Geweben exprimiert (Farelly et al., 2003; Shoeb et al., 2003; Wymore et al., 1997). Die physiologische Funktion dieser Kaliumkanaluntereinheit wurde überwiegend am Herzen untersucht. Hierbei nimmt sie bei der Beendigung des Herzaktionspotentials eine entscheidende Rolle ein. Zusätzlich weist er hier auch eine vielfältige Pharmakologie auf (Mitcheson et al., 2000). Die Untereinheiten erg2 und erg3 sind im Gegensatz zu erg1 vorwiegend im Nervengewebe exprimiert (Shi et al., 1997), obwohl sie kürzlich auch in den pankreatischen Inseln von Ratten gezeigt werden konnten (Muhlbauer et al., 2007). In einer Studie (Saganich et al., 2001) wurden erg2-Untereinheiten fast ausschließlich im Bulbus olfactorius entdeckt. In Nagerhirnen zeigen alle drei Untereinheiten ein ausgedehntes Expressionsmuster (Guasti et al., 2005; Papa et al., 2003; Saganich et al., 2001).

5.2 Eignung des Expressionssystems

Als Testsystem wurden CHO- und HEK-Zellen eingesetzt. Beide Zellsysteme exprimierten nach ihrer Transfektion mit cDNA-Vektoren, kodierend für erg1-3, die entsprechenden Kaliumkanaluntereinheiten. Die HEK-Zellen hatten eine höhere Transfektionserfolgsrate als die CHO-Zellen. Generell war die Tendenz in den Transfektionsversuchen zu beobachten, dass erg-Kaliumkanäle in CHO-Zellen in geringerer Dichte exprimiert wurden. In den angefertigten Aufnahmen von den Ergebnissen der HEK-Zellen konnte zudem auch die subzelluläre Verteilung besser erkannt werden als bei den CHO-Zellen. HEK-Zellen sind flacher und differenzierter als CHO-Zellen. Da für die Anfertigung der Aufnahmen kein konfokales Mikroskop verwendet wurde, war in den HEK-Zellen die Verteilung auf subzellulärer Ebene besser zu erkennen als in den eher kugelförmigen CHO-Zellen. Ergebnisse zeigten eindeutig den Unterschied der Homogenität der Fluoreszenz zwischen den beiden Zellsystemen. Jedoch brachten die HEK-Zellen auch einige Nachteile mit sich. Während der Versuche hafteten diese nicht so fest am Boden der Objektträger wie die CHO-Zellen, trotz

vorausgegangener Beschichtung der Böden mit Poly-D-Lysin (s. Material und Methoden). Höchste Vorsicht war bei jedem dieser Versuche geboten, die mit diesen Zellen durchgeführt wurde, da die Zellen, besonders die HEK-Zellen, sonst vor Ende des Experiments alle abgesaugt worden wären. In den höheren eingesetzten Dichten neigten diese zur Verklumpung. Einzelne Zellen und die damit zusammenhängende subzelluläre Verteilung der exprimierten erg-Kaliumkanäle konnten dann in den entsprechenden Zellhaufen unter dem Mikroskop nicht gut erkannt werden.

Wie bereits erwähnt, wurden zwei verschiedene cDNA-Ansätze in den Transfektionsversuchen, *tagged* und *untagged*, angewendet. Zellen, zuvor mit *tagged* Plasmiden transfiziert, wurden eingesetzt, um eine 1:1-Verteilung auf subzellulärer Ebene genau zu erkennen. Generell konnte durch die Immunzytochemie gezeigt werden, dass erg-Kaliumkanäle in sehr hoher Dichte intrazellulär exprimiert wurden. Die Zellmembran und der Zellkern wiesen keine deutlich sichtbaren Fluoreszenzen auf. Jedoch gab es hierbei das Problem der Überexpression, wodurch viele der erg-Kaliumkanäle in die Membran des endoplasmatischen Retikulums der Zellen eingebaut wurden. Zusätzlich kann die viel stärkere Immunreaktion der entsprechenden Immunzytochemien durch die Abwesenheit einer möglichen Interferenz der EGFP-Kopplung erklärt werden. Des Weiteren könnte man meinen, dass das angekoppelte EGFP das Andocken der Antikörper behindert.

Durch Transfektion der Zellen mit *untagged* Plasmiden und separatem EGFP wurde deutlich, dass die erg-Kaliumkanäle ein ganz anderes Verteilungsmuster als EGFP haben.

5.3 Eignung einzelner Antikörper in heterologen Expressionssystemen

Generell ist bezüglich der Immunzytochemie dieser Arbeit hervorzuheben, dass man zwar die Färbung des Zytoplasmas sehen konnte, allerdings konnten genauere Lokalisationen der erg-Kanaluntereinheiten nicht ausgemacht werden. Gezeigt werden konnte deutlich die unterschiedliche Verteilung der Immunreaktivität innerhalb der Zellen. Das Verteilungsmuster, das sich insbesondere im Zytoplasma intensiv gefärbt dargestellt hat, entsprach am ehesten Antikörpermarkierungen des Golgi-Apparates (Misumi et al., 1986; Fujiwara et al., 1988; Doms et al., 1989; Prestle et al., 1996). Zellkern und Zellmembran wurden eher ausgespart.

Diskutierte Ergebnisse einzelner Antikörper beziehen sich, soweit nicht anderweitig erwähnt, auf die Immunzytochemien an Zellen, die zuvor mit *tagged* Klonen transfiziert waren. Getestete Antikörper waren C-terminal.

5.3.1 Getestete Antikörper gegen erg1

Ergebnisse der immunzytochemischen Versuche mit den drei eingesetzten kommerziellen Antikörpern ergaben sich wie folgt:

Resultate des Antikörpers #APC016 Anti-K_v 11.1 (erg1) von Alomone Labs zeigten, dass sich dieser Antikörper allgemein für die Darstellung der Kaliumkanaluntereinheit erg1 sehr schlecht eignete. In sehr niedrig eingesetzten Verdünnungen (1:100) verursachte er viele Hintergrundfärbungen. Ab einer Verdünnung von 1:200 ergaben sich bereits sporadische Ko-Lokalisationen der grünen und roten Fluoreszenzen, hinweisend auf ein schlechtes Andocken des Antikörpers. Als Ursache hierfür könnte die Behinderung durch die EGFP-Kopplung in Frage kommen.

Der AK #APC062 Anti-hK_v 11.1 (HERG), ebenfalls von Alomone Labs hergestellt, erzeugte, ähnlich wie der AK #APC016, viele Färbungen unspezifischer Proteine wenn

in niedrigen Verdünnungen eingesetzt. Deckungsgleichungen der grünen und der roten Fluoreszenzen wurden mit zunehmender Verdünnung des Antikörpers seltener. AK #APC062 wurde zusätzlich für die Immunzytochemie an zuvor mit *untagged* Klonen transfizierten Zellen getestet. Hierbei zeigte sich ein deutliches, subzelluläres Verteilungsmuster der Immunreaktionen sowohl in CHO- als auch in HEK-Zellen. Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche Interferenz der EGFP-Kopplung hin.

Ein weiterer kommerziell erworbener Antikörper von Santa Cruz Biotechnology, sc-20130 Anti-HERG (H175) IgG, zeigte nur sporadische Ko-Lokalisationen der grünen und der roten Fluoreszenzen. Subzelluläre Verteilungsmuster innerhalb der Zellen waren zwar bei niedrig eingesetzten Verdünnungen (1:100) erkennbar, erzeugten jedoch zusätzlich viel Hintergrundfärbung.

5.3.2 Getestete Antikörper gegen *erg2*

Der kommerziell erworbene Antikörper von Alomone Labs, #APC114 Anti-K_v 11.2 (*erg2*), zeigte die intrazelluläre Verteilung nur in höheren Konzentrationen. Ab einer Verdünnung von 1:10 000 war keine Immunreaktion mehr nachweisbar.

Mit den Antikörpern aus eigener Herstellung (CR1 und CR2) konnte immunzytochemisch ein sehr deutliches intrazelluläres Verteilungsmuster in beiden Zellsystemen dargestellt werden. Es zeigte sich eine 1:1 Ko-Lokalisation der grünen und roten Fluoreszenzen, selbst wenn diese in sehr niedrigen Verdünnungen eingesetzt wurden. Dennoch erzeugte der CR2-AK mehr Hintergrundfärbungen als der CR1-AK. Optimale Ergebnisse zeigten sich, wenn diese Antikörper mit einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt wurden. Noch stärkere Immunreaktionen waren in den Ergebnissen der Immunzytochemie zu sehen, wenn die Zellen zuvor mit den *untagged* Klonen (für die *erg2*-Kanaluntereinheit kodierend) transfiziert wurden. Hierfür wurde der CR1-AK verwendet.

5.3.3 Getestete Antikörper gegen *erg3*

Die eingesetzten Antikörper TB1 und TB2 aus Eigenproduktion zeigten exakte 1:1 Ko-Lokalisationen der grünen und roten Fluoreszenzen, sowie ein deutlich hervortretendes intrazelluläres Verteilungsmuster in den Zellen. Der TB1-AK verursachte mehr Hintergrundfärbungen, als der TB2-AK. Der letztere wurde zudem auch an Zellen getestet, die zuvor mit *untagged erg3* transfiziert waren. Auch hier war die Immunreaktion stärker als bei den Versuchen mit den *tagged* Kanälen, was ebenfalls auf eine Behinderung der EGFP-Kopplung hindeutet.

Die verwendeten Antikörper sind gegen intrazelluläre Strukturen der *erg*-Kaliumkanaluntereinheiten gerichtet. Die extrazellulären Anteile ähneln sich in den einzelnen Untergruppen *erg1-3*. Diese bestehen aus dem konservierten Teil der Transmembrandomänen. Entsprechend wird an diesen Stellen keine Fluoreszenz in den immunzytochemischen Färbungen erzeugt. Dies konnte in den Kreuzreaktionen getestet werden, wobei Antikörper gegen, eigentlich nicht für sie vorgesehene, *erg*-Kanaluntereinheiten getestet wurden. Die Gegebenheit, dass der Antikörper #APC062 von Alomone Labs zusätzlich zu den *erg1*-Kanaluntereinheiten auch *erg2*-Kanaluntereinheiten detektiert hatte, könnte auf die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz der beiden Kanaluntereinheiten zurück geführt werden (Einarsen et al., 2009). Mit dem CR1-AK aus Eigenherstellung konnte ebenfalls mehr als eine Sorte der Kanaluntereinheiten nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den Immunreaktionen beim Nachweis von *erg2*-Kanaluntereinheiten zeigten sich leicht positive Reaktionen zur Darstellung der *erg1*-Kanaluntereinheiten. Diese Phänomene scheinen nicht alleine durch normale Hintergrundfärbungen der Antikörper erklärt zu werden. Die Antikörper CR2 und TB1 (beide aus Eigenproduktion) neigten zu viel stärkeren Färbungen unspezifischer Hintergrundproteine. Jedoch konnten, wie in den Kreuzreaktionen nachgewiesen, mit diesen Antikörpern immunzytochemisch keine anderen *erg*-Kanaluntereinheiten detektiert werden als jene, die für diese vorgesehen waren.

5.4 Anwendung der Antikörper für Färbungen nativer erg-Kanäle

Antikörper mit den besten Ergebnissen waren diejenigen mit der geringsten Hintergrundfärbung und einer möglichst exakten 1:1-Ko-Lokalisation der EGFPs und der Markierungen der jeweils getesteten Antikörper. Diese wurden zum Nachweis von den erg-Kanaluntereinheiten in M/T-Zellen aus Zellkulturen des Bulbus olfactorius von Mäusen (Zellkulturen angefertigt im Zentrum für Molekulare Neurobiologie) angewandt.

Die M/T-Neurone wurden über ihre Morphologie, sowie auch mit Hilfe immunzytochemischer Untersuchungen über die Anwesenheit von mGluR1-Rezeptoren (metabotrope Glutamatrezeptoren vom Subtyp 1), identifiziert. Da die Expression mGluR1 in den M/T-Zellen des Bulbus olfactorius bereits beschrieben wurde (Sahara et al., 2001; Shigemoto et al., 1992; Van den Pol, 1995), konnten die M/T-Zellen anhand von Antikörpern gegen mGluR1 (Novus Biologicals) identifiziert werden.

Die funktionelle Expression der Kanaluntereinheiten wurde elektrophysiologisch durch Messungen der einzelnen erg-Ströme über die Zellmembranen der M/T-Zellen dargestellt (Hirdes et al., 2009; s. **Abb. 31**). Elektrische Ströme im nativen Gewebe waren im Allgemeinen schwieriger nachzuweisen, da die Kanaldichte in den jeweiligen Zellen viel geringer ist als in den transfizierten heterologen Expressionssystemen. Infolgedessen brachten sie eine geringere Stromdichte hervor.

Verschiedene Neurone, aus den Bulbi olfactorii neugeborener Mäuse gewonnen, konnten morphologisch in Zellkulturen dargestellt werden. Die Neurone, die erg-Ströme enthielten, hatten relativ große Somata und wurden von dicken, prominenten Hauptdendriten gekennzeichnet. Diese morphologischen Kriterien scheinen typisch für M/T-Zellen in Primärkultur zu sein (Trombley & Westbrook, 1990). Andererseits wurde das Schlüsselenzym der GABA-Synthese, nämlich Glutamatdecarboxylase (GAD65/67), als Marker der GABAergen, granulären und paraglomerulären Interneurone des Bulbus olfactorius verwendet (Esclapez et al., 1993; Mugnaini et al., 1984). Die Ergebnisse

zeigten, dass die meisten Neurone der Kultur, die erg-Ströme beinhalten, mGluR1-positiv und GAD65/67-negativ sind. Dies weist darauf hin, dass es sich höchstwahrscheinlich um Mitral- oder Tuftedzellen handelt, jedoch nicht um Interneurone.

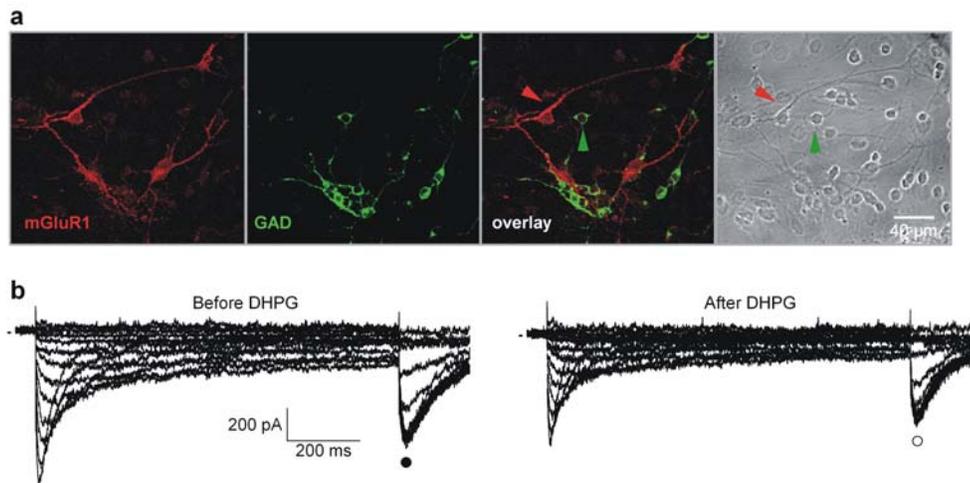


Abb. 31: erg-Ströme, funktionell exprimiert in den Zellen des Bulbus olfactorius (Quelle: Hirdes et al., 2009)

a) Immunzytochemische Identifizierung der M/T-Zellen in elf Tage alten Primärkulturen des Bulbus olfactorius neonataler Mäuse. Die roten Fluoreszenzen zeigen die Antikörpermarkierungen der mGluR1. Die grünen Fluoreszenzen stellen Markierungen der GAD65/67 dar. Zusätzlich sind die Überlagerungen der roten und grünen Fluoreszenzen und die Hellfeldaufnahmen dargestellt. Das mit einem rot markierten Pfeil dargestellte Neuron war immunpositiv auf mGluR1, aber nicht auf GAD65/67. Das mit einem grün markierten Pfeil war immunpositiv auf GAD65/67.

b) Erg-Ströme vor und nach der Applikation von (S)-3,5-Dihydroxyphenylglycin, einem selektiven mGluR1-Agonist.

Die Expression gesamter erg-Kaliumkanaluntereinheiten auf RNA-Ebene wurde mit Hilfe der Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) nach der Methode von Monyer & Jonas, 1995 (Hirdes et al., 2009) nachgewiesen. Ergebnisse hiervon zeigt **Abb. 32**. Hier wird dargestellt, dass in den M/T-Zellen die Transkripte der beiden erg1-Splicevarianten *merg1a* und *merg1b*, sowie auch die der *merg2* und *merg3* exprimiert sind.

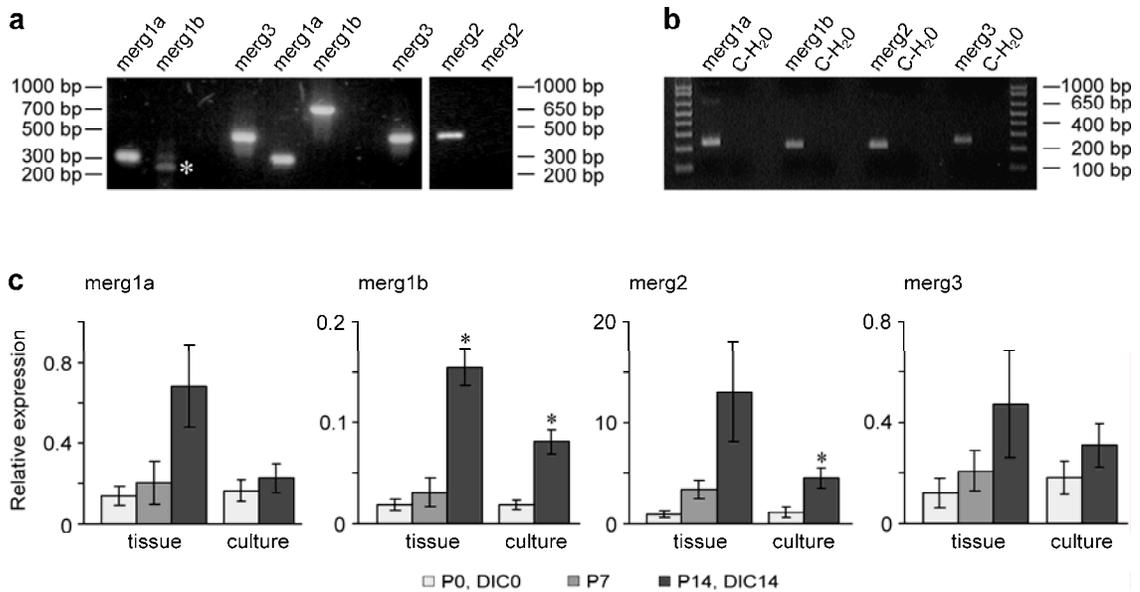


Abb. 32: Ergebnisse der Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) (Quelle: Hirdes et al., 2009)

Amplifizierte DNA-Fragmente der RT-PCR wurden durch Agarosegelelektrophorese analysiert und sequenziert. Für die Negativkontrollen wurde Extrazellulärlösung (unspezifische Zelltrümmer) oder Wasser verwendet.

a) RT-PCR der *erg*-Kanaluntereinheiten, ausgeführt mit Zytoplasma von vier bis fünf M/T-Neuronen. Gezeigt sind die Ergebnisse der 2. Amplifikationsrunde. Der weiße Asterisk deutet auf unspezifische Amplifikationen des *erg1b* hin.

b) RT-PCR einer vor 14 Tagen angesetzten Primärkultur des Bulbus olfactorius. Transkripte aller getesteten *erg*-Untereinheiten wurden nach der ersten Amplifikationsrunde nachgewiesen.

c) Ergebnisse quantitativer RT-PCR aus Gewebe des Bulbus olfactorius und dissoziiertem Bulbus olfactorius-Zellen in Primärkultur. Gewebe wurde von neugeborenen (P0), von eine Woche alten (P7) und von zwei Wochen alten (P14) Mäusen gewonnen. Dissoziierte Zellen in Kultur wurden am ersten Tag (DIC0) und nach zwei Wochen (DIC14) geprüft. Sternchen bezeichnen signifikante Unterschiede gegen P0 oder DIC0 (* $P < 0,05$).

Ergebnisse immunzytochemischer Doppelfärbungen der Zellen aus dem Bulbus olfactorius dieser Arbeit waren generell nicht sehr überzeugend was die Intensität der Fluoreszenzsignale anging. Dies liegt wohl möglich an der Gegebenheit, dass verschiedene Isoformen der einzelnen *erg*-Kanaluntereinheiten existieren (Einarsen et al., 2009; schematisch in **Abb. 33** dargestellt). Antikörper sind immer gegen ein oder mehrere bestimmte Epitope der *erg*-Kanaluntereinheit gerichtet, dessen verschiedene Splicevarianten unterschiedliche Aminosäuresequenzen aufweisen. Laut dieser Studie existiert eine Isoform der *erg3*-Kanaluntereinheit, dem der gesamte C-Terminus fehlt.

Außerdem weisen Mitralzellen eine geringere Kaliumkanaldichte auf als mit erg-Kanaluntereinheiten transfizierte Zellen der heterologen Expressionssysteme.

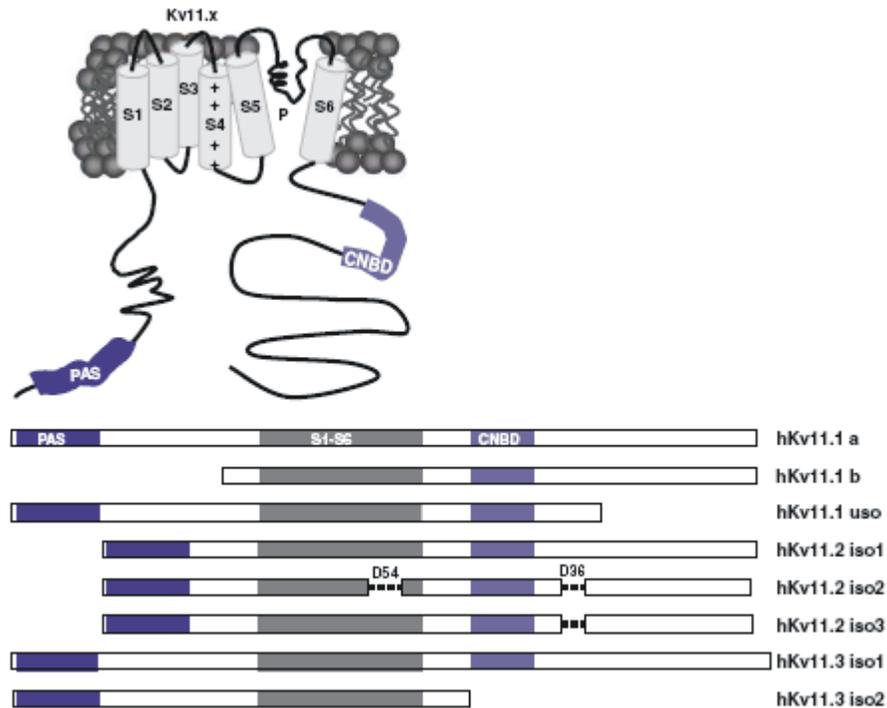


Abb. 33 Schematische Darstellung einer Kv11 Untereinheit, (Quelle: Einarsen et al., 2009) die sechs Transmembrandomänen (S1-S6) und eine Pore (P) beinhaltet. Die Positionen der PAS-Domäne des N-Terminus und die zyklische, nucleotidbindende Domäne (CNBD) am C-Terminus sind dunkelblau bzw. hellblau gekennzeichnet. Die Leistendiagramme schildern die bekannten Isoformen der drei Kanaluntereinheiten. D54 besteht aus der Differenz der Anwesenheit oder der Abwesenheit von 54 Aminosäuren; D36 besteht aus der Differenz der Anwesenheit oder der Abwesenheit von 36 Aminosäuren.

Fazit

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann man schließen, dass die Antikörper aus eigener Herstellung mindestens genauso gut einsetzbar sind wie die getesteten kommerziellen Antikörper. Bei einigen Doppelfärbungen der Immunzytochemie des nativen Gewebes wurden keine Signale erzeugt. Gründe hierfür sind möglicherweise die Existenz verschiedener Splice-Varianten oder die Kanaldichte. Es ist nicht auszuschließen, dass

einzelne Heteromultimere der Kanaluntereinheiten miteinander interagieren und somit nicht so gut erkannt werden können. Die Epitope, an denen die Antikörper normalerweise ansetzen, könnten hierdurch blockiert werden. Zudem können einzelne erg-Kanaluntereinheiten extrazellulär unterschiedlich stark glykosiliert sein, welches in einigen Fällen das Andocken von Antikörpern behindern kann. Auch können einzelne Proteine im Verlaufe des Versuchs denaturiert worden sein, da unterschiedliche Zeitspannen zwischen den Fixierungen und den darauf folgenden Immunzytochemien lagen.

Es wäre sinnvoll, Antikörper für immunzytochemische Versuche einzusetzen, die nicht nur gegen den C-Terminus der erg-Kanaluntereinheiten, sondern auch gegen den N-Terminus, gerichtet sind. Durch diese Option könnte man zusätzlich C-terminal verkürzte Isoformen der Splice-Varianten der erg-Kaliumkanaluntereinheiten detektieren.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beinhaltet zum größten Teil die immunzytochemische Testung diverser Antikörper, entweder kommerziell erworben oder aus eigener Herstellung, zum Nachweis der Kaliumkanäle *erg1-3*. Erg-Kanäle sind spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, die einwärts rektifizierende K^+ -Ströme vermitteln. Auf diese Weise sind sie bei einigen Zellen für die Repolarisation von Aktionspotentialen zuständig, oder tragen so zum Ruhemembranpotential bei. Die Untereinheiten *erg2* und *erg3* sind ausschließlich in neuronalem Gewebe exprimiert. Im Gegensatz hierzu, ist der Kaliumkanal *erg1* auch in verschiedenen nicht neuronalen Geweben exprimiert (Farrelly et al., 2003; Shoeb et al., 2003; Wymore et al., 1997).

Vor den durchgeführten Immunzytochemien wurden für die heterologe Expression die Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für verschiedene *erg*-Kanaluntereinheiten kodieren. Entsprechende cDNA-Vektoren lagen entweder an EGFP gekoppelt (*tagged*), oder ohne EGFP-Kopplung (*untagged*) vor. Als Zellsysteme wurden CHO- und HEK-Zellen verwendet. Getestete C-terminale Antikörper wurden in verschiedenen Verdünnungen titriert, um zu sehen welche einzusetzende Konzentration sich für immunzytochemische Versuche am besten eignet.

Aufnahmen der Ergebnisse wurden mit entsprechenden Filtersystemen angefertigt. Wegen der Verwendung von EGFP wurden vorwiegend rot-fluoreszierende Sekundärantikörper verwendet, um die Immunreaktivität für *erg*-Kanaluntereinheiten zu visualisieren. Um vorhandene Ko-Lokalisationen der beiden Fluoreszenzen darzustellen, wurden Überlagerungen der beiden Fluoreszenzen erstellt. Diese zeigten bei vorhandener Deckungsgleichheit gelbe Färbung. Für jede Kanaluntereinheit wurden verschiedene Antikörper getestet. Zusätzlich wurden auch einige der Antikörper auf Kreuzreaktionen überprüft. Es war hervorzuheben, dass zwar die intrazelluläre Färbung des Zytoplasmas, jedoch keine genauere Lokalisation der *erg*-Kanaluntereinheiten gesehen werden konnte. Gezeigt wurde deutlich die unterschiedliche Verteilung der Immunreaktivität innerhalb der Zellen. Zellkern und Zellmembran wurden eher

ausgespart. Durch Transfektion der Zellen mit *untagged* Plasmiden und separatem EGFP wurde deutlich, dass die *erg*-Kaliumkanäle ein ganz anderes Verteilungsmuster als EGFP haben.

Antikörper mit den am meisten zufriedenstellenden Ergebnissen bezüglich Immunreaktivität und Verdünnungen der Primärantikörper wurden für die immunzytochemischen Nachweise der *erg*-Kanaluntereinheiten im nativen Gewebe ausgewählt. Als Präparat wurden Zellkulturen des *Bulbus olfactorius* verwendet, da hier bereits gezeigt wurde, dass alle drei *erg*-Kanaluntereinheiten auf mRNA-Niveau exprimiert sind. Diese wiesen generell schwache Immunreaktivität auf, insbesondere bei dem Nachweis der *erg3*-Untereinheit. Dies ist durch eine geringere Kanaldichte im nativen Gewebe als in heterologen Expressionssystemen erklärbar, sowie auch durch unterschiedliche Zeitspannen zwischen der Fixierung und der Immunzytochemie. In Primärkulturen könnten zusätzliche Proteine und andere Strukturen mit den *erg*-Kanaluntereinheiten interagieren und somit das Ansetzen der Antikörper verhindern, daher die schwächere Fluoreszenz als in den heterologen Expressionssystemen. Des Weiteren könnte dieses Phänomen auf die Existenz verschiedener Splice-Varianten zurückgeführt werden (Einarsen et al., 2009).

7. Literaturverzeichnis

1. Akbarali H.I., Thatte H., Xe X.D., Giles W.R. & Goyal R.K. Role of HERG-like K⁺ currents in opossum esophageal circular smooth muscle. *American Journal of Physiology* **277**, C1284-1290 (1999).
2. Arcangeli A., Bianchi L., Becchetti A., Faravelli L., Coronello M., Mini E., Olivotto M. & Wanke E. A novel inward-rectifying K⁺ current with a cell cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells. *Journal of Physiology* **489**, 455-471 (1995).
3. Barros F., del Camino D., Pardo L.A., Palomero T., Giraldez T. & de la Pena P. Demonstration of an inwardly rectifying K⁺ current component modulated by thyrotropin-releasing hormone and caffeine in GH₃ rat anterior pituitary cells. *Pflügers Archiv* **435**, 119-129 (1997).
4. Baude A., Nusser Z., Roberts J.D., Mulvihill E., McIlhinney R.A. & Somogyi P. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* **11**, 771-787 (1993).
5. Bauer C.K., Engeland B., Wulfsen I., Ludwig J., Pongs O. & Schwarz J.R. RERG is a molecular correlate of the inward-rectifying K current in clonal rat pituitary cells. *Receptors Channels* **6**, 19-29 (1998).
6. Bauer C.K. & Schwarz J.R. Physiology of EAG K⁺ channels. *Journal of Membrane Biology* **182**, 1-15 (2001).
7. Breer H., Fleischer J., Strotmann J. The sense of smell: multiple olfactory subsystems. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 1465-1475 (2006).
8. Brugada R., Hong K., Dumaine R., Cordeiro J., Gaita F., Borggrefe M., Menedez T.M., Brugada J., Pollevick G.D., Wolpert C., Burashnikov E.,

- Matsuo K., Wu Y.S., Guerchicoff A., Bianchi F., Giustetto C., Schimpf R., Brugada P. & Antzelevitch C. Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* **109**, 30-35 (2004).
9. Buck L. & Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**, 175-187 (1991).
 10. Crociani O., Guasti L., Balzi M., Becchetti A., Wanke E., Olivotto M., Wymore R.S. & Arcangeli A. Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1b isoforms in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 2947-2955 (2003).
 11. Corrette B.J., Bauer C.K. & Schwarz J.R. Electrophysiology of anterior pituitary cells. In: Scherübl H. & Hescheler J. (Hrsg.). The electrophysiology of neuroendocrine cells. *CRC Press, Boca Raton, USA*. 101-143 (1996).
 12. Doms R.W., Russ G. & Yewdell J.W. Brefeldin A redistributes resident and itinerant golgi proteins to the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology* **109**, 61-72 (1989).
 13. Emmi A., Wenzel H.J., Schwartzkroin P.A., Tagliatella M., Castaldo P., Bianchi L., Nerbonne J., Robertson G.A. & Janigro D. Do glia have a heart? Expression and functional role for ether-à-go-go currents in hippocampal astrocytes. *Journal of Neuroscience* **20**, 3915-3925 (2000).
 14. Einarsen K., Calloe K., Grunnet M., Olesen S.-P. & Schmitt N. Functional properties of human neuronal Kv11 channels. *Pflügers Archiv* **458**, 689-700 (2009).
 15. Esclapez M., Tillakaratne N.J., Tobin A.J. & Houser C.R. Comparative localization of mRNAs encoding two forms of glutamic acid decarboxylase with nonradioactive in situ hybridization methods. *Journal of Comparative Neurology* **331**, 339-362 (1993).

16. Farrelly A.M., Ro S., Callaghan B.P., Khoiy M.A., Fleming N., Horowitz B., Sanders K.M. & Keef K.D. Expression and function of KCNH2 (HERG) in the human jejunum. *American Journal of Physiology* **284**, G883-G895 (2003).
17. Fujiwara T., Oda K., Yokota S., Takatsuki A. & Ikehara Y. Brefeldin A causes disassembly of the golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 18545-18552 (1988).
18. Guasti L., Cilia E., Crociani O., Hofmann G., Polvani S., Becchetti A., Wanke E., Tempia F. & Arcangeli A. Expression pattern of the *ether-à-go-go*-related (ERG) family proteins in the adult mouse central nervous system: evidence for coassembly of different subunits. *Journal of Comparative Neurology* **491**, 157-174 (2005).
19. Guan K.L. & Dixon J.E. Eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Analytical Biochemistry* **192**, 262-267 (1991).
20. Gurrola G.B., Rosati B., Rocchetti M., Pimienta G., Zaza A., Arcangeli A., Olivotto M., Possani L.D. & Wanke E. A toxin to nervous, cardiac and endocrine erg K⁺ channels isolated from centruroides noxius scorpion venom. *The FASEB Journal* **13**, 953-962 (1999).
21. Gussak I., Brugada P., Brugada J., Wright R.S., Kopecky S.L., Chaitman B.R. & Bjerregaard P. Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology* **94**, 99-102 (2000).
22. Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B. & Sigworth F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* **391**, 85-100 (1981).

23. Hayar A., Heyward P.M., Heinbockel T., Shipley M.T. & Ennis M. Direct excitation of mitral cells via activation of alpha 1-noradrenergic receptors in rat olfactory bulb slices. *Journal of Neurophysiology* **86**, 2173-2182 (2001).
24. Hirdes W., Napp N., Wulfsen I., Schweizer M., Schwarz J.R. & Bauer C.K. Erg K⁺ currents modulate excitability in mouse mitral/tufted neurones. *Pflügers Archiv* **459**, 55-70 (2009).
25. Lees-Miller J.P., Kondo C., Wang L. & Duff H.J. Electrophysiological characterization of an alternatively processed erg K⁺ channel in mouse and human hearts. *Circulation Research* **81**, 719-726 (1997).
26. Lillich J.D., Rakestraw P.C., Roussel A.J., Finley M.R., Ganta S. & Freeman L.C. Expression of the *ether-à-go-go* (ERG) potassium channel in smooth muscle of the equine gastrointestinal tract and influence on activity of the jejunal smooth muscle. *American Journal of Veterinary Research* **64**, 367-372 (2003).
27. London B., Trudeau M.C., Newton K.P., Beyer A.K., Copeland N.G. & Gilbert D.J. Two isoforms of the mouse *ether-à-go-go*-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K⁺ current. *Circulation Research* **81**, 870-878 (1997).
28. Martin L.J., Blackstone C.D., Huganir R.L. & Price D.L. Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron* **9**, 259-270 (1992).
29. Misumi Y., Misumi Y., Miki K., Takatsuki A., Tamura G. & Ikehara Y. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 11398-403 (1986).

30. Mitcheson J.S., Chen J., Lin M., Culberson C. & Sanguinetti M.C. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**, 12329-12333 (2000).
31. Monyer H. & Jonas P. Polymerase chain reaction analysis of ion channel expression in single neurons of brain slices. In: Sakmann B. & Neher E. (eds) *Single-channel recording, 2nd edn. Plenum, New York*, pp 357-373 (1995).
32. Morais Cabral J.H., Lee A., Cohen S.L., Chait B.T., Li M. & Mackinnon R. Crystal structure and functional analysis of of the HERG potassium channel N-terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell* **95**, 649-655 (1998).
33. Mugnaini E., Wouterlood F.G., Dahl A.L. & Oertel W.H. Immunocytochemical identification of GABAergic neurons the main olfactory bulb of the rat. *Archives Italiennes de Biologie* **122**, 83-113 (1984).
34. Mühlbauer E., Bazwinsky I., Wolgast S., Klemenz A. & Peschke E. Circadian changes of *ether-à-go-go*-related-gene (Erg) potassium channel transcripts in the rat pancreas and beta-cell. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**, 768-780 (2007).
35. Nakanishi S. Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation and plasticity. *Neuron* **13**, 1031-1037 (1994).
36. Overholt J.L., Ficker E., Yang T., Shams H., Bright G.R. & Prabhakar N.R. Chemosensing at the carotid body. Involvement of a HERG-like potassium current in glomus cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **475**, 241-248 (2000).
37. Oyha S., Horowitz B. & Greenwood I.A. Functional and molecular identification of erg-channels in murine portal vein myocytes. *American Journal of Cell Physiology* **283**, C866-C877 (2002).

38. Papa M., Boscia F., Canitano A., Castaldo P., Sellitti S., Annunziato L. & Tagliatalata M. Expression pattern of the *ether-a gogo*-related (erg) K⁺ channel encoding genes *erg1*, *erg2* and *erg3* in the adult rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology* **466**, 119-135 (2003).
39. Parr E., Pozo M.J., Horowitz B., Nelson M.T. & Mawe G.M. Erg K⁺ channels modulate the electrical and contractile activities of gall bladder smooth muscle. *American Journal of Physiology* **284**, G392-398 (2003).
40. Pellequer J.L., Brudler R. & Getzoff E.D. Biological sensors: More than one way to sense oxygen. *Current Biology* **9**, R416-418 (1999).
41. Pillozzi S., Brizzi M.F., Balzi M., Crociani O., Cherubini A., Guasti L., Bartolozzi B., Becchetti A., Wanke E., Bernabei P.A., Olivotto M., Pegoraro L. & Arcangeli A. HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic hemopoietic progenitors. *Leukemia* **16**, 1791-1798 (2002).
42. Pongs O. Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Letters* **452**, 31-35 (1999).
43. Prestle J., Pfizenmaier K., Brenner J. & Johannes F.J. Protein kinase C_μ is located at the golgi compartment. *Journal of Cell Biology* **134**, 1401-1410 (1996).
44. Saganich M.J., Machado E. & Rudy B. Differential Expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K⁺ channels in brain. *The Journal of Neuroscience* **21**, 4609-4624 (2001).
45. Sahara Y., Kobuta T. & Ichikawa M. Cellular localization of metabotropic glutamate receptors mGluR1, 2/3, 5 and 7 in the main and accessory olfactory bulb of the rat. *Neuroscience Letters* **321**, 59-52 (2001).

46. Sanguinetti M.C., Jiang C., Curran M.E. & Keating M.T. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* **81**, 299-307 (1995).
47. Sanguinetti M.C., Curran M.E., Spector P.S. & Keating M.T. Spectrum of HERG K^+ channel dysfunction of an inherited cardiac arrhythmia. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **93**, 2208-2212 (1996A).
48. Schäfer R., Wulfsen I., Behrens S., Weinsberg F., Bauer C.K. & Schwarz J.R. The erg-like potassium current in rat lactotrophs. *Journal of Physiology* **518**, 401-416 (1999).
49. Schmidt R.F., Thews G. & Lang F. *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag Berlin (2005).
50. Schönherr R. & Heinemann S.H. Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. *Journal of Physiology* **493**, 635-642 (1996).
51. Shi W., Wymore R.S., Wang H.S., Pan Z., Cohen I.S. & McKinnon D. Identification of two nervous system-specific members of the erg potassium channel gene family. *Journal of Neuroscience* **17**, 9423-9432 (1997).
52. Shigemoto R., Nakanishi S. & Mizuno N. Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: an in situ hybridization study in adult and developing rat. *Journal of Comparative Neurology* **322**, 121-135 (1992).
53. Shoeb F., Malykhina A.P. & Akbarali H.I. Cloning and functional characterization of the smooth muscle *ether-à-go-go*-related gene K^+ channel. Potential role of a conserved amino acid substitution in the S4 region. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 2503-2514 (2003).

54. Shoeb F., Malykhina A.P. & Akbarali H.I. (2004). Additions and corrections to: Shoeb F., Malykhina A.P. & Akbarali H.I. (2003). Cloning and functional characterization of the smooth muscle *ether-à-go-go*-related gene channel. Potential role of a conserved amino acid substitution in the S4 region. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 2503-2514 (2003); *Journal of Biological Chemistry* **278**, 2503-2514 (2003); *Journal of Biological Chemistry* **279**, 48486 (2004).
55. Siri H.O. & Torleiv O.R. The sudden infant death syndrome gene: does it exist? *Paediatrics* **114**, 506-512 (2004).
56. Smith D.B. & Johnson K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase. *Gene* **67**, 31-40 (1988).
57. Snyders D.J. & Chaudhary A. High affinity open channel block by dofetilide of HERG expressed in a human cell line. *Molecular Pharmacology* **49**, 949-955 (1996).
58. Spector P.S., Curran M.E., Zou A., Keating M.T. & Sanguinetti M.C. Fast inactivation causes rectification of the I_{kr} channel. *Journal of General Physiology* **107**, 611-619 (1996).
59. Swanson C.J., Bures M., Johnson M.P., Linden A.M., Monn J.A. & Schoepp D.D. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nature Reviews* **4**, 131- 144 (2005).
60. Tagliatela M., Pannaccione A., Castaldo P., Giorgio G., Zhou Z., January C.T., Genovese A., Marone G. & Annunziato L. Molecular basis for the lack of HERG K^+ channel block-related cardiotoxicity by the H1 receptor blocker cetirizine compared with other second generation antihistamines. *Molecular Pharmacology* **54(1)**, 113-121 (1998).

61. Trombley P.Q. & Westbrook G.L. Excitatory synaptic transmission in cultures of rat olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology* **64**, 598-606 (1990).
62. Van den Pol A.N. Presynaptic metabotropic glutamate receptors in adult and developing neurons: autoexcitation in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology* **359**, 253-271 (1995).
63. Warmke L., Drysdale R. & Ganetzky B. A distinct potassium channel polypeptide encoded by the drosophila eag locus. *Science* **252**, 1560-1562 (1991).
64. Warmke J.W. & Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to eag in drosophila and mammals. *Proceeding of the National Academy of Science USA* **91**, 3438-3442 (1994).
65. Wymore R.S., Gintant G.A., Wymore R.T., Dixon J.E., McKinnon D. & Cohen I.S. Tissue and species distribution of mRNA for the I_{kr} -like K^+ channel, ERG. *Circulation Research* **80**, 261-268 (1997).
66. Zhang S., Zhou Z., Gong Q., Makielski J.C. & January C.T. Mechanism of block and identification of the verapamil- binding domain to HERG potassium channels. *Circulation Research* **84**, 989-998 (1999).

8. Danksagung



Zuerst danke ich Prof. Dr. Christiane Bauer. Sie ermöglichte es mir, eine experimentelle Doktorarbeit im damaligen Institut für Angewandte Physiologie durchzuführen. Ihre kontinuierliche Begleitung und Unterstützung waren von unschätzbarem Wert für das Gelingen dieser Arbeit.

Dr. Iris Wulfsen danke ich für die Zeit, die sie sich genommen hat, um mir die wichtigsten Dinge ganz ausführlich bis ins kleinste Detail zu erklären. Das hat mich wirklich jedes Mal ein ganzes Stück weitergebracht.

Ingeborg Blank, Annett Hasse und Waltraud Krüger: Vielen Dank an Euch für die praktische Einarbeitung zu Beginn, und für Eure stete Hilfsbereitschaft.

Prof. Dr. J.R. Schwarz und allen anderen Mitarbeitern des damaligen Instituts für Angewandte Physiologie danke ich für ihre kollegiale Unterstützung und die nette Zusammenarbeit.

My daughter Vanessa and the rest of my family: You mean so much to me, I love you all.

Trust the Lord with all your heart and lean not on your own understanding; in all your ways acknowledge Him, and He will make your paths straight. (Proverbs 3:5-6)

9. Lebenslauf

Natalie Stamm

Tangstedter Landstrasse 443
22417 Hamburg

e-mail: nataliestamm@yahoo.co.uk
Tel.: 040/23490948
0176/62293190

Persönliche Daten: Geburtsdatum: 02/06/1980

Geburtsort: Warendorf

Nationalität: Deutsch

Schulbildung:

- 1986-1992:

Grundschule, Zimbabwe

- 1993-1996:

General Certificate of Education at Ordinary Level, Zimbabwe

- 1997-1998:

General Certificate of Education Advanced Level, Zimbabwe,

Fächer: Mathematik, Physik, Chemie

Studium:

- Aug. 1999 – Juni 2001:

University of Zimbabwe

Studiengang: Bachelor of Science General Degree o.A.

Fächer: Physik, Chemie

- Apr. 2002 – Mai 2009:

Universität Hamburg, Studiengang Medizin

März 2005

Ärztliche Vorprüfung:

Famulaturen:

- Sep. 2005: **Department of Medicine**, United Bulawayo Hospitals, Bulawayo, **Zimbabwe**

- Apr. 2007: **Rechtsmedizin**, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

- Aug. 2007: **Kardiologische Praxis** Dr. Hinrichs und Prof. Markworth, Schäferkampsallee, Hamburg

- Sep. 2007: **Kardio-Klinik Hamburg**, Jerusalem

Krankenhaus, Hamburg

Praktisches Jahr: Feb. 2008 – Juni 2008: **Innere Medizin**, Asklepios Klinik-Nord, Hamburg

Juni 2008 – Sep. 2008: **Chirurgie**, Asklepios Klinik-Nord, Hamburg

Sep. 2008 – Jan. 2009: **Wahlterial Gynaekologie und Geburtshilfe**, Diakonieklinikum Elim, Hamburg

Staatsexam:

- Apr. 2009: **2.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, schriftlicher Teil**
- Mai 2009: **2.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, mündlich-praktischer Teil**

Approbation:

Juni 2009, Hamburg

Promotion

(ausstehend):

„Immunzytochemischer Nachweis von ether-à-go-go-related gene Kaliumkanaluntereinheiten im nativen Gewebe und heterologen Expressionssystemen“, Institut für Angewandte Physiologie (Prof. Dr. J.R. Schwarz), Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Berufliche Tätigkeit:

Seit Okt. 2009:

Heinrich-Sengelmann Krankenhaus, Bargfeld-Stegen:
Assistenzärztin im Bereich **Suchtmedizin und allgemeinpsychiatrische Erkrankungen**

10 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung der Promotion beworben habe.

Hamburg, den _____.____._____

Natalie Stamm