

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. med. H. Ehmke

**Klonierung eines spannungsabhängigen Kaliumkanals der
Kv4-Familie im linksventrikulären Myokard des Schweins**

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von
Bernhard Michael Schoensee
aus Heilbronn/Neckar
Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

1.	Einleitung	5
2.	Material und Methoden.....	9
2.1	Einführung	9
2.2	Methoden zur Herstellung der „Ausgangs-cDNA“	12
2.2.1	Gewinnung von Myokardgewebe.....	12
2.2.2	Isolation von Gesamt-RNA	12
2.2.3	RT-Polymerase/Reaktion.....	14
2.2.3.1	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	15
2.2.3.2	Nachweis durch Agarose-Gelelektrophorese.....	18
2.2.3.3	Isolierung von DNA aus dem Agarose-Gel	21
2.2.4	Subklonierung der DNA-Fragmente in pGEM-T-Vektoren	22
2.2.5	Herstellung kompetenter Bakterien.....	23
2.2.6	Transformation und Kultivierung	24
2.2.7	Sicherung der Fragmente: Anlegen von Bakterien-Stocks	26
2.2.8	Präparation von Plasmid-DNA	26
2.3	Sequenzspezifische Hydrolyse der isolierten Plasmid-DNA	28
2.3.1	Identifikation der Zielsequenz durch DNA-Sequenzierung.....	30
2.4	Nachweis der Zielsequenz durch Southern Blotting.....	31
2.5	Methoden zur Darstellung des 3'- und 5'-Endes der Zielsequenz... 33	
2.5.1	Amplifikation des 3'-Endes der cDNA mittels RACE-PCR	34
2.5.1.1	Herstellung von Erst-Strang-cDNA für eine 3'-RACE-PCR	35
2.5.1.2	Durchführung einer 3'-RACE-PCR	36
2.5.1.3	Durchführung einer nested 3'-RACE-PCR	38
2.5.2	Amplifikation des 5'-Endes der cDNA mittels RACE-PCR	39
2.5.2.1	Erst-Strang-Synthese von cDNA für eine 5'-RACE-PCR.....	40
2.5.2.2	Aufreinigung der cDNA für eine 5'-RACE-PCR	41
2.5.2.3	Hinzufügen einer Poly-C-Sequenz an die cDNA für eine 5'-RACE-PCR.....	42
2.5.2.4	Durchführung einer 5'-RACE-PCR	43
2.6	Auflistung der verwendeten Primer für die durchgeführten PCR- und Amplifikationsreaktionen:.....	44
2.7	Isolierung und Lagerung von <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten.....	46
2.8	Injektion der cRNA in <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten	46
2.9	Elektrophysiologische Methoden	47
2.9.1	Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode	47
2.9.2	Versuchsablauf.....	48
3.	Ergebnisse	51
3.1	Expressionsnachweis von Kv4- α -mRNA im linksventrikulären Schweinemyokard	51
3.2	Weitere Klonierung des 3'- und 5'-Endes des PCR-Fragmentes: ... 52	
3.2.1	Schrittweise Identifikation der Nukleotidsequenz durch PCR- Amplifikationen	52
3.2.2	Amplifikation des Gesamtklons (full length clone).....	55
3.3.1	Nukleotidsequenz des Gesamtklons.....	56
3.3.2	Vergleich mit der Nukleotidsequenz des Kv4.2 Kaliumkanals der Ratte	57
3.3.3	Vergleich mit der Nukleotidsequenz des Kv4.2 Kaliumkanals des Menschen	61

3.3.4	Vergleich der Aminosäuresequenzen vom Kv4.2 der Ratte, des Kv4.2 des Menschen und der amplifizierten Schweinsequenz	67
3.3.5	Heterologe Expression der Kv4- α -Untereinheit des Schweineherzens	70
4.	Diskussion	71
4.1	Expression des Kv4.2 im linken Ventrikel des Schweineherzens	71
4.2	Sequenz von Kv4 im Schweineherzen.....	71
4.2.1	Veränderungen im Bereich der Phosphorylierungsstellen	71
4.2.2	Veränderungen im Bereich der KChIP-Bindungsstellen.....	72
4.3	Funktion des Kv4.2 des Schweineherzens	73
4.4	Expression des Kv4.2-Protein in linksventrikulären Myozyten des Schweins	73
4.5	Beeinflussung der Funktion der Kv4-Untereinheiten durch KChIP ..	74
4.6	Expression von I_{to1} in linksventrikulären Kardiomyozyten beim Schwein	74
4.7	Ausblick	76
5.	Zusammenfassung.....	77
6.	Abkürzungsverzeichnis	78
6.1	Verwendete Abkürzungen von Maßeinheiten	78
6.2	Verwendete Buchstabenkodierung der Aminosäuren.....	78
6.3	Weitere Abkürzungen	79
7.	Abbildungsverzeichnis.....	80
8.	Literaturverzeichnis	81
9.	Danksagung.....	89
10.	Lebenslauf.....	90
11.	Eidesstattliche Versicherung.....	93

1. Einleitung

Der spannungsabhängige transiente Auswärtsstrom (I_{to}) (to = „transient outward“) spielt für den physiologischen Ablauf von Aktionspotenzialen im Myokard bei unterschiedlichen Spezies eine entscheidende Rolle. So wird der I_{to} in der frühen Phase der Repolarisation aktiviert [69, 100, 101], bestimmt die Höhe des frühen Plateaus der Aktionspotenziale und beeinflusst in der nachfolgenden Phase weitere an der Repolarisation beteiligte Ströme [29]. Für den I_{to} ist darüber hinaus beschrieben, dass seine Stromstärke bei myokardialen Erkrankungen wie z. B. Vorhofflimmern [95,104], Herzhypertrophie [84, 91, 99], nach Herzinfarkt [43] oder Herzversagen [46, 62] abnimmt. Die Reduktion der I_{to} -Stromstärke geht entsprechend der Literatur mit einer Verlängerung der Aktionspotenzialdauer einher [11, 18, 69]. In diesem Zusammenhang wird von vielen Studien darauf hingewiesen, dass ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Abnahme der I_{to} -Stromstärke sowie der Zunahme der Aktionspotenzialdauer einerseits [7, 40, 43, 46, 87, 83, 93] und einer verstärkten Neigung zur Entstehung von kardialen Arrhythmien [30, 47, 50, 93] andererseits besteht.

Weitere elektrophysiologische Charakterisierungen des I_{to} haben gezeigt, dass sich der Gesamtstrom des I_{to} aus mehreren Komponenten zusammensetzt. So ist zum einen eine 4-Aminopyridin-sensitive Komponente, der transiente Kalium-Auswärtsstrom (I_{to1}) und zum anderen eine nicht durch 4-Aminopyridin (4-AP) blockierbare Komponente, der sogenannte Ca^{2+} -aktivierte transiente Chlorid-Auswärtsstrom (I_{to2}), beschrieben worden [19, 37, 48, 106, 107]. Das Vorhandensein und die Größe der jeweiligen Anteile von I_{to1} und I_{to2} sind jedoch speziesabhängig. In Untersuchungen an Hasen konnten sowohl I_{to1} als auch I_{to2} in atrialen [38, 106], und ventrikulären Myozyten [37] sowie in Purkinjefasern [86] nachgewiesen werden. Beide Komponenten wurden auch in myokardialen Zellen von Kaninchen [93, 107, 108] und Schafen [19, 48] gefunden. Beim Frettchen [16], bei der Ratte [20], und beim Menschen [56] wurde dagegen ausschließlich I_{to1} nachgewiesen. Während bei den Nagetieren

angenommen wird, dass der I_{to1} den Hauptanteil des repolarisierenden Stromes bildet [4, 65, 94], ist bei größeren Säugetieren und beim Menschen, die eine geringere Herzfrequenz aufweisen und eine längere Aktionspotenzialdauer haben, die genaue Rolle des I_{to1} letztlich unklar [29].

Der I_{to1} , der nicht nur am Herzen, sondern auch in anderen Organen wie z. B. im neuronalen Gewebe des ZNS nachgewiesen werden kann [39], zeigt als ein weiteres Charakteristikum eine schnelle Aktivierung und Inaktivierung und wird aufgrund dieser Eigenschaften auch als A-Typ-Strom bezeichnet. In der Literatur werden als porenbildende molekulare Hauptkomponenten [57] für den neuronalen [81] sowie den kardialen [7, 24, 27, 103] I_{to1} die Mitglieder der Kv4-Kaliumkanal-Familie beschrieben. Zu dieser Familie von spannungsabhängigen Kaliumkanälen gehören mehrere Mitglieder (Kv4.1, Kv4.2, Kv4.3).

Die Expression von Kv4-Kaliumkanal-Familienmitgliedern ist bei verschiedenen Spezies, wie z. B. bei der Ratte [7, 13, 24, 68, 82, 92], bei der Maus [70, 81], beim Hund [25] sowie beim Menschen [23, 49, 105], untersucht und nachgewiesen worden. Bezüglich des menschlichen Herzens ist davon auszugehen, dass wahrscheinlich Kv4.3 die Hauptkomponente des I_{to1} ist [25, 47], bei der Ratte jedoch am ehesten Kv4.2 und Kv4.3 gemeinsam für die Expression des I_{to} verantwortlich sind [8, 21].

Gestützt wird diese These, dass Kv4-Kanäle für die Expression des I_{to1} verantwortlich sind, durch etliche Untersuchungen, in denen z. B. durch Inhibition der Kv4-Kanäle mittels Antisense-Vorbehandlung [27] oder mittels Überexpression eines dominant-negativen Konstrukts [40, 45] gezeigt werden konnte, dass es dabei zur Suppression des I_{to1} kommt. Eine genetische Inaktivierung von Kv4.2 bei Mäusen hatte gar den Verlust des I_{to1} zur Folge [9, 50], wobei je nach genetischem Konstrukt zusätzlich verschiedene kardiale Fehlfunktionen, wie die Verlängerung der Aktionspotenzialdauer, Verlängerung des QT-Intervalls, ventrikuläre Tachykardien, dilatative Kardiomyopathie und Herzversagen, induziert wurden [9, 31, 50, 102].

Elektrophysiologische Untersuchungen am Herzmuskelgewebe des Menschen und des Kaninchens haben gezeigt, dass nicht davon auszugehen ist, dass

der I_{to1} gleichmäßig exprimiert ist. In den einzelnen Regionen des Herzens [1, 3, 56, 69, 80] und innerhalb der freien Ventrikelwand [18, 54, 63] konnten in zahlreichen Versuchen signifikante Unterschiede hinsichtlich der Stromgröße sowie einzelner elektrophysiologischer Eigenschaften des I_{to1} nachgewiesen werden. So unterliegt z. B. innerhalb der Ventrikelwand die Größe des I_{to1} einem starken Gradienten. In epikardnahen Kardiomyozyten des Kaninchens, der Ratte und des Menschen ist der I_{to1} wesentlich größer [54, 80, 98, 101] und die Zeit der Erholung von der Inaktivierung wesentlich kürzer [14, 63] als in endokardnahen Zellen. Passend dazu weist auch die Aktionspotenzialdauer bei Ratte und Mensch einen transmuralen Gradienten auf. Dem entsprechend ist diese im Epikard deutlich geringer als im Endokard [18, 63]. Bei diesen Untersuchungen hatte sich auch gezeigt, dass die Aktionspotenzialdauer umgekehrt proportional zu der Stärke des I_{to1} ist [18, 63]. Die Zusammenschau der Ergebnisse legt nahe, dass die Größe des I_{to1} in hohem Maße ausschlaggebend für den transmuralen Gradienten der Aktionspotenzialdauer ist. Dieser Gradient wiederum ist bedeutsam für den physiologischen Ablauf einer geordneten Repolarisation des linken Ventrikels.

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass dieser transmurale Gradient der Aktionspotenzialdauer, wie er für menschliche Herzzellen oder auch bei Nagetieren nachgewiesen wurde, auf Myokardzellen des Schweins nicht so ohne weiteres zutrifft. Aktionspotenziale, die am Schweineherzen subepikardial abgeleitet wurden, waren nur unwesentlich kürzer als die, die in den restlichen Schichten des Myokards gemessen wurden [73].

Das Schweineherz, eigentlich ein gebräuchliches experimentelles Modell, das bereits in zahlreichen Untersuchungen zur Exploration von kardiovaskulären Erkrankungen genutzt wird [51, 94, 96, 97] und darüber hinaus auch hinsichtlich geplanter Xenotransplantationen eine gewichtige Rolle spielen könnte [52], ist im Vergleich zu den Herzen anderer Spezies bezüglich seiner zellulären elektrophysiologischen Eigenschaften nur unzureichend untersucht. Auch die Analysen zur Expression des I_{to1} sind davon betroffen. Die verschiedenen Einzelergebnisse der wenigen zu diesem Thema vorhandenen Publikationen stehen zudem in einem gewissen Widerspruch zueinander.

Beschreiben Lacroix et al. [51] in ihrer Publikation, dass ein kleiner I_{to1} in den Myozyten des linken Ventrikels eines Schweineherzens eindeutig identifiziert werden kann, so ergaben im Unterschied dazu die elektrophysiologischen Messungen von Li et al. [55], dass der I_{to1} im linken Ventrikel des Schweineherzens funktionell gar nicht exprimiert sei. Li et al. hatten zwar bei ihren Messungen an einzelnen Myokardzellen des Schweins ein Phase-One-Notch, der bei zahlreichen anderen Säugetieren als signifikanter Hinweis für das Vorhandensein eines I_{to1} angesehen wird [29], registriert. Nach Ansicht der Autoren [55] werde dieser Phase-One-Notch beim Schwein allerdings nicht durch den I_{to1} generiert sondern durch das Vorhandensein und die Aktivität eines Ca^{2+} -aktivierten Chlorid-Stromes hinreichend erklärt.

Eigene unveröffentlichte elektrophysiologische Untersuchungen, die durch Prof. Tilmann Volk in unserem Labor durchgeführt wurden, ergaben, dass passend zu der These von Lacroix et al. [51] ein sehr kleiner 4-Aminopyridin-sensitiver Strom in isolierten linksventrikulären Myozyten beim Schwein messbar ist, der dem I_{to1} durchaus entsprechen könnte. Die Ergebnisse bildeten den Ausgangspunkt für diese Arbeit, in der folgenden Fragestellungen nachgegangen wurde:

- 1.) Sind im linksventrikulären Gewebe des Schweineherzens Kv4- α -Untereinheiten als morphologische Korrelate für den I_{to1} exprimiert?
- 2.) Inwiefern unterscheiden sich gegebenenfalls klonierte Mitglieder der Kv4-Familie des Schweins von den aus anderen Spezies bekannten Kv4-Kanal-Typen hinsichtlich ihres molekularen Aufbaus?
- 3.) Sind gegebenenfalls Abweichungen im molekularen Aufbau gegenüber bisher bekannten Kv4-Nukleotidsequenzen mitbestimmend für eine sehr niedrige Expression des I_{to1} in linksventrikulären Myozyten des Schweineherzens?

2. Material und Methoden

2.1 Einführung

Bei der zellulären Genexpression werden zunächst im Zellkern von genomischer DNA RNA-Kopien angefertigt. Den RNA-Kopien kommt eine Botenfunktion zwischen Zellkern und Zytoplasma zu. Sie werden deshalb als messenger-RNA (mRNA) bezeichnet. Die mRNA verlässt den Zellkern und lagert sich im Zytoplasma an Ribosomen an. An den Ribosom-RNA-Komplexen erfolgt die Synthese des entsprechenden Proteins. Der Nachweis spezifischer mRNA kann einen Hinweis auf eine mögliche Expression eines Gens geben. Im Bezug auf die Kv4-Familie konnte in Untersuchungen der letzten Zeit gezeigt werden, dass eine hohe Korrelation zwischen Expression der mRNA und der Ausprägung des I_{to} [25,32] besteht.

Zum Nachweis der Kv4-mRNA wurde zunächst aus Gewebe des freien linken Ventrikels des Schweineherzens Gesamt-RNA isoliert. Darauf wurde durch Reverse Transkriptase (RT) an den mRNA-Molekülen komplementäre Erst-Strang-cDNA synthetisiert. Alle bekannten Mitglieder der Kv4-Familie verfügen auf DNA-Ebene über Abschnitte mit sehr hoher Übereinstimmung. So lässt sich die entsprechende DNA unter Verwendung von sogenannten degenerierten Primern mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachweisen. Die degenerierten Primer, die in unseren Experimenten Verwendung fanden, waren ein Primergemisch, das nur insoweit spezifisch war, als dass ähnliche, aber nicht identische DNA-Sequenzen amplifiziert wurden. So konnten Teile mehrerer Subtypen von KV4 mittels einer PCR-Amplifikation hergestellt werden (Kv 4.1, 4.2, und 4.3).

Die Voraussetzung hierfür war das Vorhandensein von hoch konservierten Regionen bei den KV4-Kanälen. Zur Überprüfung, ob die durch die PCR erhaltenen DNA-Stücke von der erwarteten Länge waren, wurden die amplifizierten Fragmente mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Zur weiteren Spezifizierung des Fragmentes wurde ein Southern

Blotting mittels DNA-Sonden durchgeführt. Um die DNA-Fragmente eindeutig zu identifizieren und darüber hinaus den einzelnen Mitgliedern der KV4-Familie zuordnen zu können, wurden die Fragmente zunächst aus dem Agarose-Gel eluiert und anschließend sequenziert.

Zur Gewinnung einer zur Sequenzierung ausreichenden Materialmenge wurde die DNA mit Hilfe von ringförmigen DNA-Molekülen, sogenannten Plasmiden, in Bakterien eingeschleust. Durch Aufspaltung des DNA-Ringes der Plasmide mittels Restriktionsendonukleasen wurden die amplifizierten DNA-Fragmente in die Plasmide eingefügt. Die beiden freien Enden des Plasmids wurden durch eine Ligase mit dem DNA-Fragment verknüpft. Die durch die Ligation entstandenen sogenannten rekombinierten DNA-Moleküle wurden in einem Transformationsvorgang von den Bakterien über die Zellwand aufgenommen. Der dazu verwendete *Escherichia coli*-Stamm besitzt keine natürliche Transformationskompetenz, so dass die Bakterien zunächst durch chemische oder physikalische Methoden „kompetent“ gemacht werden müssen. Die artifiziellen Plasmide können sich, ebenso wie natürlich vorkommende Plasmide, im Bakterium unabhängig vom Genom vermehren und werden bei der Zellteilung dann an die Tochterzellen weitergegeben. Durch Kultivierung der transformierten Bakterien unter standardisierten Bedingungen erhält man eine Vervielfältigung der rekombinierten DNA-Moleküle. Nach der Vermehrung wurde dann die Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen isoliert. Die DNA-Fragmente wurden mittels Restriktionsendonukleasen aus dem Plasmid-Ring herausgeschnitten und anschließend durch Gelelektrophorese von den Plasmid-Fragmenten getrennt. Von diesem DNA-Fragment aus wurde mittels der RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends), die auch als „one-sided“ oder „anchored“ PCR beschrieben wird, die Sequenz des Genabschnittes fortschreitend dargestellt. Durch diese Methode war die Amplifikation von DNA-Sequenzen zwischen einem bekannten Abschnitt auf der cDNA und dem 5'- oder 3'-Ende möglich. Das Ausgangsmaterial zur Untersuchung der unbekannt Sequenz war wieder mRNA. Um die Sequenz in Richtung des 3'-Endes der mRNA (3'-RACE-PCR) darzustellen, wurde die isolierte mRNA zunächst mittels eines sogenannten Adapter Primers, der an alle

polyadenylierten mRNAs anlagerte, in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde eine PCR mit einem sogenannten genspezifischen Primer (GSP) und einem Abridged Universal Amplification Primer (AUAP) durchgeführt. Der AUAP lagert sich am zum 3'-Ende der mRNA komplementären Teil der cDNA an. Der AUAP hat eine zum Adapter Primer homologe Sequenz. Der GSP wurde so konstruiert, dass er sich an eine bekannte Sequenz innerhalb des cDNA-Moleküls anlagerte.

Um die Spezifität des PCR-Produktes zu erhöhen, wurde teilweise eine zweite 3'-PCR gemacht, bei der das zuvor amplifizierte PCR-Produkt als Ausgangs-DNA benutzt wurde. Dabei wurde ebenfalls der Abridged Universal Amplification Primer (AUAP) sowie ein zweiter genspezifischer Primer verwendet, der in Bezug auf den ersten GSP in Richtung 3'-Ende der cDNA lag. Nach einer PCR wurde das Produkt nach erfolgter Transformation und Präparation sequenziert. Mit Hilfe der neu hinzugekommenen Sequenzen wurden neue genspezifische Primer konstruiert. Zur Amplifikation in 5'-Richtung wurde bereits bei der Transkription von mRNA in Erst-Strang-cDNA mit einem genspezifischen Primer (GSP 1) gearbeitet. Durch das Umschreiben mittels Reverser Transkriptase und des GSP 1 stellten sich nach Gelelektrophorese unterschiedlich lange Banden dar. Den Anhaltspunkt für die richtige Länge lieferten die bisher bekannten Mitglieder der Kv4-Familie. Das entstandene Erst-Strang-cDNA-Fragment hatte als 5'-Ende die Sequenz des GSP 1. Im nächsten Schritt wurde durch die Ligation einer Poly-C-Sequenz an das 3'-Ende des Fragments eine Bindungsmöglichkeit für den sogenannten Abridged Anchor Primer geschaffen. Mit Hilfe eines zweiten genspezifischen Primers (GSP 2) und des Abridged Anchor Primers konnte mittels PCR amplifiziert werden. Bei der Konstruktion von GSP 1 und GSP 2 wurde darauf geachtet, dass sich der GSP 2 bezüglich des GSP 1 in Richtung 3'-Ende der Erst-Strang-cDNA befand, was als „nested“ bezeichnet wird. Oft erzeugte eine Amplifikation mit 35 Zyklen nicht genügend spezifische Produkte, um sie durch Gelelektrophorese zu identifizieren, weshalb eine 0,1%ige Verdünnung des ersten PCR-Produktes erneut amplifiziert wurde. Als Primer wurden AUAP oder UAP und ein weiterer nested GSP verwendet. Nach Auffinden der

START- und STOP-Codons konnten flankierende Primer zur Amplifikation des Gesamtklons (full length clone) konzipiert werden. Der amplifizierte Gesamtklon bildete die Voraussetzung für eine heterologe Expression in *Xenopus*-Oozyten und somit für eine elektrophysiologische Charakterisierung des Schweinespezifischen Kv4-Kaliumkanals mittels Patch-Clamp-Technik.

2.2 Methoden zur Herstellung der „Ausgangs-cDNA“

2.2.1 Gewinnung von Myokardgewebe

Für die Untersuchungen wurden männliche Hausschweine mit einem Gewicht zwischen 20 und 30 kg verwendet. Die Narkose wurde durch intravenöse Applikation von 14 mg/kg Pentobarbital eingeleitet und mit Isofluran (1,0 bis 1,5 %) in der Atemluft aufrechterhalten. In der Atemluft war das Verhältnis von N₂O zu O₂ 2 : 1. Nach Thoraxeröffnung wurde das Herz entnommen und die freie Wand des linken Ventrikels abgetrennt und gewogen. Anschließend wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingelagert.

2.2.2 Isolation von Gesamt-RNA

Der schnelle Aufschluss der Zellen ist entscheidend für die Qualität der gewonnenen RNA. Beim Aufschluss von RNA aus Zellen werden große Mengen RNAsen freigesetzt, die im Reaktionsansatz durch Guanidiniumisothiocyanat inhibiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die RNA-Isolation mittels der sauren Guanidiniumisothiocyanat-Methode durchgeführt [17], wobei die RNA unter sauren Bedingungen in einer Phenol-Chloroform-Extraktion von Proteinen und genomischer DNA getrennt wird und anschließend in Ethanol gefällt wird.

Zunächst wurde das Herzmuskelgewebe in einem Porzellanmörser mit flüssigem Stickstoff pulverisiert. 400 mg des gekühlten, pulverisierten Myokards wurden in ein Rundbodenröhrchen mit 4000 µl Trizol-Reagenz (Life Technologies, Eggenstein, Deutschland) überführt. Anschließend erfolgte für 2 Minuten eine Homogenisierung (Ultra-Turrax, Janke & Kunkel). Zur Phasentrennung wurden je 1000 µl des Homogenats in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß umgesetzt und 10 Minuten bei 11 000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge 5417 R, Eppendorf). Der RNA enthaltende Überstand wurde in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, das Pellet wurde verworfen. Um die komplette Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe zu ermöglichen, wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Extraktion der RNA wurden je 200 µl Chloroform zugegeben und anschließend wurde 15 Sekunden von Hand geschüttelt. An die dreiminütige Inkubation bei Raumtemperatur schloss sich eine Zentrifugation von 15 Minuten mit 12 000 rpm bei 4 °C an. Im Reaktionsgefäß waren jetzt- von oben nach unten betrachtet- eine farblose, wässrige Lösung, eine Interphase und eine rote Phenol-Chloroform-Phase zu erkennen. Die RNA befand sich in der oberen, wässrigen Phase. Diese wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Cup umgesetzt und je Cup 500 µl Isopropanol zugegeben. Anschließend wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann 10 Minuten mit 11 000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war bodennah an der Wand des Reaktionsgefäßes ein gallertartiges RNA-Pellet zu erkennen. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Zum Waschen des Pellets wurden 1000 µl 75%iges Ethanol zugegeben, anschließend wurde 5 Minuten mit 7500 rpm bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zugabe von Ethanol und das Zentrifugieren wurden dreimal wiederholt. Nach dem letzten Durchgang wurde das RNA-Pellet 10 Minuten bei geöffnetem Reaktionsgefäß luftgetrocknet. Danach wurde das Pellet mit 20 µl DPEC-Wasser durch vorsichtiges, wiederholtes Aufziehen mit einer Pipette gelöst und anschließend für 10 Minuten bei 56 °C inkubiert. Quantität und Qualität der isolierten Gesamt-RNA wurden mit einem Spektralphotometer

(Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech) bei 260 nm bestimmt. Die Lagerung der RNA bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80 °C.

2.2.3 RT-Polymerase/Reaktion

Die Synthese von cDNA aus der aus dem Schweineherzen isolierten RNA wurde nach dem von Lee und Caskey [53] beschriebenen Verfahren durchgeführt. Da fast bei allen RNAs aus Eukaryonten am 3'-Ende Poly-A-Sequenzen gefunden werden [28], wurde ein Primer gewählt, der an diese Stelle bindet. Im „Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis“ der Firma Life Technologies waren alle benötigten Reagenzien gebrauchsfertig enthalten.

Durchführung

Zu 4 µg gelöster RNA in einem Eppendorf-Gefäß (A) wurde 1 µl Oligo (dT)-Primer hinzu gegeben und mit DPEC-Wasser ad 12 µl aufgefüllt. Einer Inkubation von 10 Minuten bei 70 °C folgte eine Inkubation von 1 Minute auf Eis. Während dieser Inkubation wurde in einem separatem Eppendorf-Gefäß (B) eine Lösung mit 7 µl Volumen angesetzt. Es wurde streng auf die angegebene Reihenfolge geachtet. Nacheinander wurden 2 µl 10x PCR-Puffer, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 2 µl DTT (0,1 M) zugegeben. Der dNTP-Mix bestand jeweils aus 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Der 10x PCR-Puffer bestand aus 200 mM Tris-HCl (pH 8,4) und 500 mM KCl. Nach Beendigung der Inkubation wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes B in das Reaktionsgefäß A gegeben. Das Gesamtvolumen betrug jetzt 19 µl. Danach wurden beide Lösungen für 20 Sekunden sanft von Hand gemischt und 10 Sekunden mit 4000 rpm zentrifugiert (Biofuge pico, Haereus), um den Inhalt wieder am Gefäßboden zu sammeln. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 42 °C (Thermoblock, Biometra) wurde 1 µl des Enzyms Reverse Transkriptase (200 U/µl) zum Start des Umschreibvorganges zugegeben. Der Name des Life-Technologies-Produktes war Superscript II. Im Anschluss wurde nochmals bei 42 °C inkubiert, dieses mal für 50 Minuten. Um

die Reaktion zu beenden erfolgte eine Inkubation bei 70 °C für 15 Minuten, danach wurde das Reaktionsgefäß für eine Minute auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugation von 10 Sekunden und 4000 rpm wurde die Lösung mit 1 µl RNase-H (2 U/µl) versetzt und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Bei diesem Schritt wurde die RNA der zuvor gebildeten DNA-RNA-Hybrid-Doppelstränge zerstört, so dass die synthetisierte cDNA in Einzelsträngen vorlag. Die Quantität und Qualität der in den 21 µl Gesamtvolumen enthaltenen cDNA wurde spektralphotometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech) bestimmt. Die gewonnene cDNA wurde entweder sofort zur PCR eingesetzt oder bei –20 °C gelagert.

2.2.3.1 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [76] dient der Amplifikation einer definierten DNA-Sequenz in vitro. Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode ist das Vorhandensein bekannter Sequenzen, die antiparallel liegen und den zu amplifizierenden Bereich einschließen. Anhand der Nukleotidabfolge dieser Randbereiche müssen einzelsträngige Oligonukleotide konstruiert werden, die der DNA-abhängigen Polymerase als Startsequenz für die PCR dienen. Die als Primer bezeichneten Startsequenzen binden komplementär an den DNA-Abschnitt, der als Zielsequenz amplifiziert werden soll. Bei der Auswahl der Primer muss darauf geachtet werden, dass die Dissoziationstemperatur der Primerpaare übereinstimmt. Am 3'-Ende der Primer dürfen keine komplementären Basen stehen, da diese Dimere untereinander bilden können [5, 42]. Weiterhin muss die Bildung von sekundären Strukturen infolge sterischer Hemmung der Anlagerung vermieden werden [66, 77]. DNA-Polymerasen besitzen die Fähigkeit, anhand eines vorhandenen DNA-Einzelstranges einen komplementären DNA-Strang aufzubauen. Für die Funktion der Polymerase muss der Einzelstrang in einem kurzen Bereich doppelsträngig vorliegen. Dies ist an solchen Stellen der Fall, an denen sich der Primer an den Einzelstrang anlegt. Als Ausgangs-DNA kann

sowohl genomische DNA als auch cDNA oder klonierte DNA eingesetzt werden. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA einmalig durch Erhitzen auf etwa 93-95 °C in die komplementären Einzelstränge aufgetrennt. Gleichzeitig wird bei dieser Denaturierung die DNA-Polymerase aktiviert. Als DNA-Polymerase wurde in der vorliegenden Arbeit Taq-Polymerase verwendet. Die Taq-Polymerase stammt von *Thermophilus aquaticus* und hat ein Temperaturoptimum von 72 °C [86]. Im zweiten Schritt lagern sich die Primer bei einer für jedes Primerpaar spezifisch zu ermittelnden Temperatur (Annealing-Temperatur) an den jeweils komplementären Abschnitt der DNA-Einzelstränge an. Die Annealing-Temperaturen liegen zwischen 48 und 70 °C. Im dritten Schritt führt die Taq-Polymerase die DNA-Synthese bei einer Temperatur von 72 °C durch. Ausgehend von den Primern wird in 3'-Richtung ein zur Ausgangs-DNA komplementärer DNA-Strang aufgebaut (Extension). Somit entstehen zunächst wieder neue DNA-Stränge, deren 5'-Enden der Primersequenz entsprechen und deren 3'-Enden eine variable Länge haben. Die Annealing-Phase und die Extensionsphase werden zyklisch wiederholt. Da die Aktivität der DNA-Polymerase mit zunehmender Reaktionsdauer nachlässt, kann trotz theoretischer Verdopplung der DNA-Menge pro Zyklus praktisch kein exponentieller Anstieg der DNA-Menge erreicht werden. Nach etwa 35 Zyklen ist die eingesetzte DNA-Polymerase erschöpft. Vor Beendigung der PCR wird eine einmalige verlängerte Extensionsphase durchgeführt.

Durchführung

Ein dünnwandiges 0,2 ml fassendes PCR-Gefäß wurde auf Eis gestellt und 24,5 µl autoklaviertes Aqua dest., 5 µl 10x PCR-Puffer, 3 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTP-Mix, je 3 µl der beiden spezifischen Oligonukleotid-Primer (10 µM) und 1 µl der transkribierten cDNA eingebracht. Unmittelbar vor dem Start der PCR wurden zu dem Reaktionsansatz 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) gegeben und mit einer Pipettenspitze vorsichtig umgerührt. Der 10x PCR-Puffer bestand aus 200 mM Tris-HCl (pH 8,4) und 500 mM KCl. Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug nach Zugabe der Taq-Polymerase 50 µl. Als genspezifische Primer wurden der Upper Primer

5'-T(CT)ATCGA(CT)G-TGGTGGCCATC-3' (1022–1042) und der Lower Primer 5'-TGGTAGAT(GC)C(GT)(AG)CT-(AG)AAGTT-3' (1454–1473) verwendet, die für den Kv4.2-Kanal der Ratte (M59980) spezifisch konstruiert wurden. Die Ziffern in Klammern bezeichnen die Position der Primer in der cDNA von Kv4.2 der Ratte. Die Angaben über die Sequenzen und Lokalisation der Primer wurden von der GenBank des „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bezogen.

Die Amplifikationsreaktion im Perkin-Elmer-DNA-Thermal-Cycler (GeneAmp-PCR-System 2400) startete mit einer initialen Denaturierungsphase von 5 Minuten bei 94 °C. Anschließend wurden 35 Zyklen mit je einer Denaturierungsphase von 30 Sekunden, einer Primerhybridisierungsphase von 30 Sekunden und einer Extensionsphase von 40 Sekunden durchlaufen. Die Denaturierung erfolgte bei 94 °C und die Extension bei 72 °C. Die Temperatur für die Hybridisierung der Primer musste für jedes Primerpaar ausgetestet werden. Um das Optimum für die Anlagerung des jeweiligen Primers an die cDNA zu finden, wurde das Temperaturintervall von 48 bis 60 °C in Schritten von 1 °C durchlaufen, wobei für jeden Schritt eine PCR angesetzt wurde. Mit einer finalen Extensionsphase von 10 Minuten bei 72 °C wurde der Amplifikationsprozess beendet. Um Kontaminationen auszuschließen, wurde für jeden PCR-Ansatz eine Negativkontrolle amplifiziert, die sämtliche für die PCR notwendigen Reagenzien, mit Ausnahme von der Ausgangs-DNA, enthielt.

Verwendete Primer

Adapter Primer (AP): 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)17-3'

Universal Amplifikation Primer (UAP):

5'-(CUA)4GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'

AP und UAP enthalten Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Sal I, Mlu I und Spe I.

Verwendete Lösungen/Puffer

10x PCR-Puffer:	200 mM Tris-HCl
	500 mM KCl
	pH 8,4

2.2.3.2 Nachweis durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Trennung geladener Moleküle im elektrischen Feld nach der Größe. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen wandern DNA-Fragmente im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Mit der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Moleküle im Bereich von 50 bis 20 000 bp aufgetrennt werden. Der prozentuale Anteil der Agarose bestimmt die Porengröße der Gelmatrix. Unterschiedliche Agarosekonzentrationen ermöglichen eine besonders gute Auftrennung von DNA-Fragmenten [77]. in definierten Größenbereichen [Abbildung 1].

Agarosekonzentration im Gel (%)	Länge der DNA-Fragmente (bp)
0,6	1000 – 20000
1,2	400 – 6000
1,5	200 – 3000
2,0	100 - 2000

Abbildung 1: Agarosekonzentration und optimal darstellbare DNA-Fragmentlängen [Quelle: Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York] [77]

In der vorliegenden Arbeit wurden 1%ige Agarose-Gele verwendet. Um die Auftrennung der DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde der

Agaroselösung Ethidiumbromid zugefügt. Ethidiumbromid ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich aufgrund seiner aromatischen Struktur bevorzugt zwischen benachbarte Basen einlagert und somit überwiegend in die DNA interkaliert [85]. Bei Bestrahlung mit UV-Licht (254–300 nm) emittiert der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex orangefarbiges Licht im sichtbaren Bereich (500–590 nm). Die Intensität des emittierten Lichtes ist proportional zur Menge der in die DNA eingelagerten Ethidiumbromid-Moleküle.

Durchführung

Zur Herstellung eines Agarose-Gels wurde 1 % Agarose mit TAE-Puffer so lange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig im Puffer aufgelöst hatte. Zur Anfärbung der DNA wurde Ethidiumbromid (Sigma) in einer Konzentration von 0,5 µg/ml während des Polymerisationsprozesses des Agarose-Gels untergemischt. Anschließend wurde die Agaroselösung in den sogenannten Gelschlitten gegossen. Durch das Einstecken eines PVC-Kammes in die polymerisierende Agaroselösung entstanden sogenannte Geltaschen. Die PCR-Produkte (10 µl) wurden mit je 2 µl Loading-Puffer auf 1 %ige Agarose-Gele aufgetragen und bei einer angelegten Spannung von 110 Volt im elektrischen Feld für 30 Minuten aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE-Puffer. Die mit Ethidiumbromid angefärbten amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe von UV-Licht (UV-Transilluminator, Biometra) bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und zur Dokumentation mit einer CCD-Kamera (Computar) fotografiert. Zur Bestimmung der Fragmentlänge anhand ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld wurde als Größenstandard eine 1 kb-DNA-Ladder [Abbildung 2] (Invitrogen) verwendet.

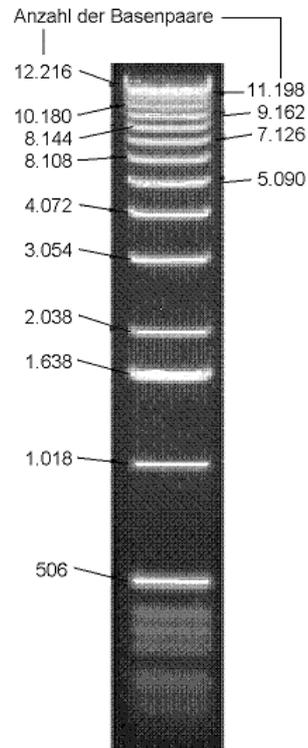


Abbildung 2: 1 kb-DNA-Ladder zur Bestimmung der Fragmentlänge
[Quelle: Promega]

Verwendete Lösungen

Die verwendeten Lösungen setzen sich wie folgt zusammen:

Loading-Puffer: 50 % Glycerol
 1 % Bromphenolblau, gesättigt
 1 % Xylenecyanol (10 %)
 2 % 50x TAE

TAE (50x): 242 g Tris
 57,1 g Eisessig
 100 ml EDTA (0,5 M), pH 8,0
 ad 1000 ml

TBE-Puffer (0,5x):	54 g Tris
	27,5 g Borsäure
	20 ml EDTA, pH 8.0
	ad 1000 ml
	1: 10 verdünnt

2.2.3.3 Isolierung von DNA aus dem Agarose-Gel

Die DNA-Fragmente, die der erwarteten Basenpaar-Anzahl entsprachen, wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, gewogen und mit Hilfe eines QIAquick-Gel-Extraction-Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben eluiert. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelstück in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und die dreifache Menge QG-Puffer zugegeben. Im Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf) wurde die DNA durch ein 10-minütiges Erwärmen auf 50 °C bei 225 rpm in Lösung gebracht. Nach Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol wurde die Lösung in die mitgelieferte Filtersäule umgesetzt und für 1 Minute mit 12 000 rpm (Zentrifuge 5417 C, Eppendorf) zentrifugiert. Die DNA war jetzt an die Filtersäule gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurden 750 µl PE-Puffer zugegeben und erneut wurde für 1 Minute mit 12 000 rpm zentrifugiert, der Durchsatz wurde verworfen. Dieser Schritt, der zur Reinigung der DNA diente, wurde dreimal wiederholt, und nach dem letzten Durchgang die Filtersäule auf ein Eppendorf-Gefäß gesteckt. Nach der Zugabe von 50 µl EB-Puffer wurde 1 Minute gewartet und dann 1 Minute mit 12 000 rpm zentrifugiert. Die DNA befand sich im Durchsatz. Für die Klonierung in Bakterien wurden 4 µl des Durchsatzes in ein Vektorsystem eingesetzt.

2.2.4 Subklonierung der DNA-Fragmente in pGEM-T-Vektoren

Zur Ligation wurde das pGEM-T-Vektor-System I der Firma Promega Corporation benutzt [Abbildung 3]. Der pGEM-T-Vektor trägt ein Ampicillinresistenzgen (Amp^r) und kodiert für das α -Peptid der β -Galaktosidase (lacZ-Gen). Aufgrund des Antibiotikaresistenzgens kann man auf ampicillinhaltigen Nährböden nach plasmidtragenden Zellen selektionieren. Die Expression des lacZ-Gens lässt sich durch IPTG induzieren und benötigt ein funktionales episomal kodiertes α -Peptid. Durch enzymatische Spaltung von X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-D-Galaktopyranosid) entsteht im Falle eines funktionalen lacZ-Gens ein Farbstoff, der die Bakterienkolonien blau färbt. Durch Einbringen von Fremd-DNA wird der Leserahmen des lacZ- α -Peptid-Gens zerstört, so dass die Spaltung von X-Gal unterbleibt und die rekombinanten Escherichia coli-Kolonien farblos sind. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei Raumtemperatur war die DNA im Plasmid-Ring aufgenommen. Das Gesamtvolumen betrug 10,5 ml.

Durchführung

Es wurde ein Ligationsansatz aus 5 μ l Ligationspuffer, 0,5 μ l pGEM-T-Vektor (55 ng/ μ l), 4 μ l der eluierten DNA-Fragmente und 1 μ l T4-DNA-Ligase (3 U/ μ l) in ein Eppendorf-Gefäß pipetiert.

Verwendete Lösungen

Ligationspuffer:	60 mM Tris-HCl, pH 7,8
	20 mM DTT
	20 mM MgCl ₂
	1 mM ATP 10 % PEG

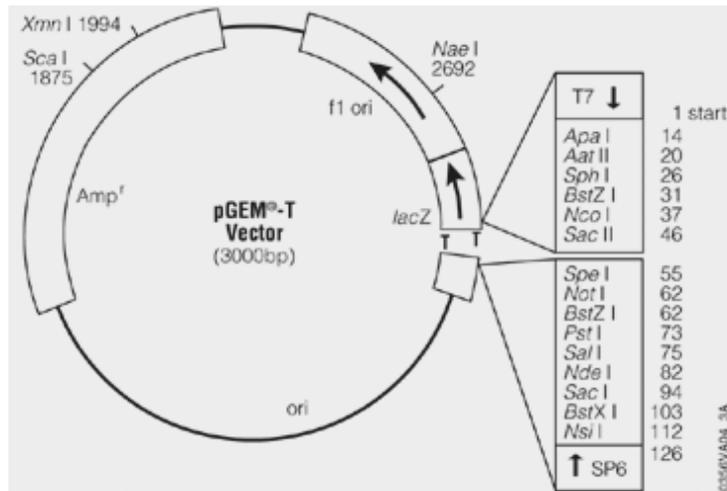


Abbildung 3: Schematische Darstellung des pGEM-T Vektors mit Auflistung der Restriktionsenzymstimmungen, Größe: 3000 bp, Amp^r: Ampicillinresistenzgen, lacZ:-Gen des α -Peptid der β -Galaktosidase [Quelle: Invitrogen]

2.2.5 Herstellung kompetenter Bakterien

Escherichia coli besitzt keine natürliche Transformationskompetenz und muss durch chemische oder physikalische Methoden kompetent gemacht werden. Bei dem hier verwendeten chemischen Verfahren [34] wurden osmotisch stabilisierte Suspensionen von Escherichia-coli-DH5 α -Stämmen bei 4 °C mit Calciumchlorid-Lösung behandelt. Der Bakterienstamm Escherichia coli DH5 α wurde von der Firma Invitrogen bezogen.

Durchführung

25 ml Übernachtskultur von Escherichia coli DH5 α wurden in 80 ml Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) geimpft und unter Schütteln (Inkubationsschüttler, Infors) mit 3000 rpm bei 37 °C für 3,5 Stunden inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf vier Falcon-Reaktionsgefäße (4 ml) verteilt und 5 Minuten mit 4000 rpm bei 4 °C zentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus). Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellsediment in 5 ml TFB 1 resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte eine

erneute Zentrifugation mit 1800 rpm für 5 Minuten bei 4 °C. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Zellsediment in 1 ml TFB 2 resuspendiert. Die auf diese Weise behandelten Bakterien wurden als kompetente Bakterien bezeichnet. Aliquots von jeweils 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C bis zum weiteren Gebrauch eingelagert.

Verwendete Lösungen:

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

TFB-1-Lösung:	30 mM KAc
	50 mM MnCl
	100 mM KCl
	10 mM CaCl ²
	15 % Glycerol
TFB-2-Lösung:	10 mM MOPS
	75 mM CaCl ²
	10 mM KCl
	15 % Glycerol
LB-Medium:	Hefeextrakt 5 g/l
	10 g/l Trypton
	pH 7,5

2.2.6 Transformation und Kultivierung

Bei der Transformation werden osmotisch stabilisierte Suspensionen von *Escherichia coli* DH5α bei 0 °C mit Calciumchlorid-Lösung behandelt und danach einem kurzen Hitzeschock ausgesetzt. Es ist von einer Transformationseffizienz von 10⁷ bis 10⁸ Transformanten / µg Plasmid-DNA auszugehen. Vermutlich lockert Calciumchlorid die Zellwandstruktur, und zusätzlich fällt die DNA als schwerlösliches Calciumsalz auf der Zelloberfläche

aus, was die direkte Aufnahme der Plasmide erleichtert [34,35]. Um Bakterien mit und ohne fremdes DNA-Fragment im Plasmid zu unterscheiden, wurden dem Ansatz ein Laktoseanalogon und ein Enzyminduktor für die β -Galaktosidase (X-Gal und IPTG) beigemischt. Bakterienkolonien, deren Plasmide kein fremdes DNA-Fragment enthielten, waren blau gefärbt, Kolonien mit rekombinierten DNA-Plasmiden waren weiß gefärbt. Auf den ampicillinhaltigen LB-Agarplatten wuchsen nur Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten und damit über das Enzym β -Lactam-Aminohydrolase verfügten.

Durchführung

Die bei -80°C eingelagerten kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Der Ligationsansatz von $10,5\ \mu\text{l}$ wurde in $100\ \mu\text{l}$ der Lösung mit kompetenten Bakterien eingebracht und mit einer Pipettenspitze vorsichtig umgerührt. Nach einer Minute auf Eis folgte eine Inkubation von 2,5 Minuten bei 37°C , danach folgten weitere 2 Minuten auf Eis. Nach Zugabe von $200\ \mu\text{l}$ LB+Glukose wurden die Bakterien in einem Rotationsinkubator (Thermomixer 5436, Eppendorf) bei 37°C und 225 rpm für 2,5 Stunden inkubiert. Dem Ansatz wurden $40\ \mu\text{l}$ X-Gal und $20\ \mu\text{l}$ IPTG zugefügt. Es folgte das Ausplattieren mit einem Drigalski-Spatel auf LB-Agarplatten, die mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin versetzt waren.

Danach erfolgte eine Inkubation der Agarplatten für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Agarplatten umgedreht und im Brutschrank für 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Je $25\ \text{ml}$ LB+Glukose+Ampicillin wurden anschließend mit weißen Einzelkolonien, die mit einer Pipette von der Agarplatte entnommen wurden, geimpft und im Rotationsinkubator (Schüttelinkubator, Infors) bei 37°C und 90 rpm für 12 Stunden inkubiert.

Verwendete Lösungen/Reagenzien

IPTG: 100 mM Isopropylthio-
galaktosid (Invitrogen)

LB-Medium:	10 g Trypton 5g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 Liter H ₂ O pH 7,5
LB-Medium+Glukose:	10 ml 20%ige Glukose ad 1 Liter LB-Medium
LB-Medium+Glukose+Ampicillin:	100 mg Ampicillin ad 1 Liter LB+Glukose
LB-Agarplatten mit Ampicillin:	15 g Bacto Agar 100 mg Ampicillin ad 1 Liter LB-Medium
X-Gal:	Dimethylformamid (20 mg/ml, Merck EuroLab)

2.2.7 Sicherung der Fragmente: Anlegen von Bakterien-Stocks

Um die in den Bakterien enthaltene Plasmid-DNA jederzeit wieder vervielfältigen zu können, wurden von den 12 Stunden inkubierten Bakterienkulturen je 850 µl abgenommen und in 1,8 ml Cryo-Tube gegeben. Nach der Zugabe von 250 µl Glycerol wurde durch vorsichtiges Aufziehen in der Pipette gemischt und anschließend bei -80 °C eingelagert.

2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolation der Plasmide aus den Bakterienzellen wurde die Bakterienwand zerstört, die DNA vom Zytosol getrennt und anschließend aufgereinigt. Dazu

wurde die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly angewandt [12].

Durchführung

Die Übernachtskulturen wurden bei 4 °C mit 4000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert (Eppendorf 5417 R). Am Gefäßboden war ein Pellet zu erkennen. Der Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden in 3 ml eiskaltem TSE-Puffer gelöst. Anschließend wurden je 1500 µl der Lösung in Eppendorf-Gefäße umgesetzt. Während der folgenden Zentrifugation von 10 Minuten bei 4 °C und 10 000 rpm wurde die Lösung B angesetzt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 125 µl der eiskalten Lösung A gelöst. Nach der Zugabe von 250 µl der Lösung B wurde für 5 Sekunden geschüttelt (Minishaker MS 2, IKA) und das Reaktionsgefäß anschließend für 15 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden 187 µl Lösung C zugegeben, 10 Sekunden wurde sanft von Hand gemischt und erneut für 15 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 4 °C und 10 000 rpm zentrifugiert und von dem klaren Überstand wurden 400 µl in neue Eppendorf-Gefäße gegeben. Nach Einbringen von je 200 µl Phenol und Chloroform-Mix in ein Reaktionsgefäß wurde für 2 Minuten mit 12 000 rpm (Zentrifuge 5417 C, Eppendorf) zentrifugiert. Im Reaktionsgefäß waren jetzt eine obere, klare Phase, eine Interphase und eine untere, weißlich trübe Phase zu erkennen. Von der obersten Phase wurden 400 µl abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß gesetzt, die anderen Phasen wurden verworfen. Nach der Zugabe von 400 µl Isopropanol wurde 30 Minuten bei -20 °C gefällt und dann für 15 Minuten mit 12 000 rpm (Zentrifuge 5417 C, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Anschließend wurden 500 µl 70% ges Ethanol zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 15 Minuten bei 12 000 rpm und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet 20 Minuten getrocknet (Concentrator 5301, Eppendorf). Das die Plasmid-DNA enthaltende Pellet wurde in 20 µl autoklaviertem Aqua dest. gelöst.

Verwendete Lösungen/Puffer

Chloroform-Mix:	24 ml Chloroform 1 ml Isoamyl-t
Lösung A:	5 ml 20 % Glukose 2 ml 0,5 M EDTA 1,25 ml 2 M Tris ad 100 ml Wasser
Lösung B:	500 µl SDS (10%) 100 µl 10 M NaOH ad 5 ml Wasser
Lösung C:	5 M KaAc (pH 6,0)
TSE-Puffer:	Saccharose 10,3 % Tris-HCl 25 mM EDTA 25 mM

Lösung A wurde nach dem Ansetzen steril filtriert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Lösung B wurde erst unmittelbar vor dem Gebrauch angesetzt.

2.3 Sequenzspezifische Hydrolyse der isolierten Plasmid-DNA

Zur Hydrolyse wurden Restriktionsendonukleasen mit sequenzspezifischer Spaltung eingesetzt [Abbildung 4]. Die Mehrzahl dieser Typ-II-Restriktionsenzyme erkennen und hydrolysieren DNA-Moleküle an bestimmten Tetra- oder Hexanukleotidsequenzen, die eine zweifache Rotationssymmetrie zeigen. Diese Palindrome besitzen in $5'\rightarrow 3'$ -Leserichtung auf den komplementären Strängen eine identische Sequenz. Die Enzyme haben jeweils spezifische Reaktionsbedingungen in Bezug auf Inkubationstemperatur

und Pufferzusammensetzung. Es wurden zwei Enzyme mit überlappenden Arbeitsbereichen in einem sogenannten Doppelverdau eingesetzt.

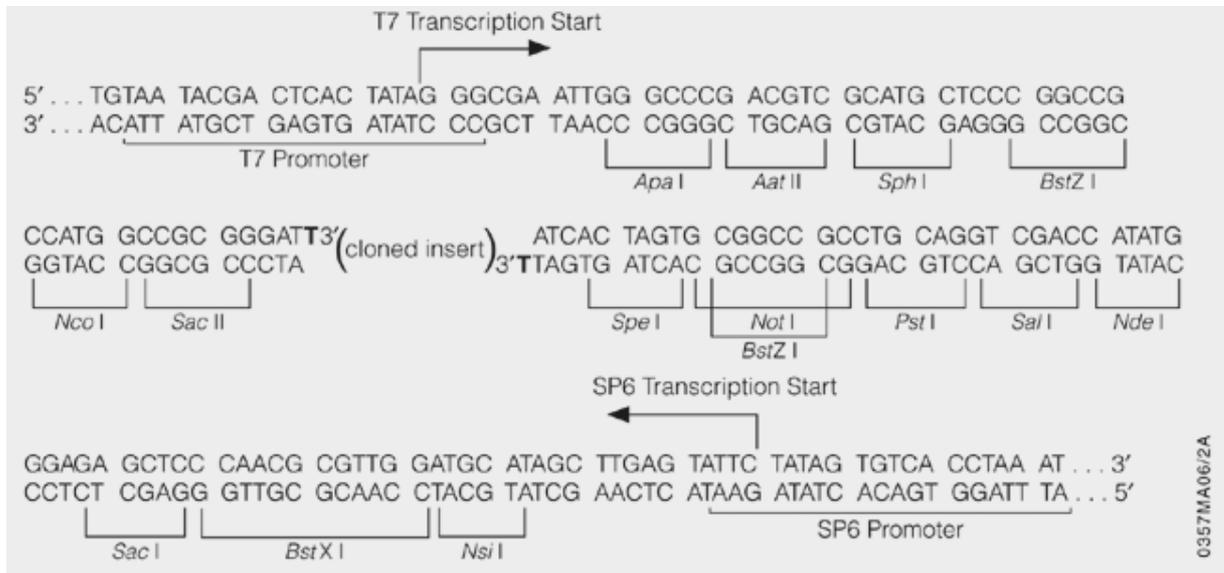


Abbildung 4: pGemT Enzymschnittstellen [Quelle: Promega]

Durchführung

Für die enzymatische Restriktionsanalyse wurde die präparierte Plasmid-DNA eingesetzt, die in 15 µl Wasser gelöst wurde. Der Reaktionsansatz enthielt die in 6 µl gelöste DNA, 1 µl 10x Puffer (NE-Puffer 2), 1 µl BSA (100 µg/ml) und je 1 µl der Restriktionsenzyme *Spe* I und *Sph* I. Alle Reagentien wurden von der Firma New England Bio Labs bezogen. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C im Thermoblock (Tb 1, Biometra) erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente in einem 1%iges Agarose-Gel, wie oben beschrieben. Nach Elution der DNA-Banden wurde im Konzentrator (Concentrator 5311, Eppendorf) getrocknet und anschließend in 20 µl autoklaviertem Aqua dest. gelöst.

Verwendete Lösungen

Der 10x Puffer (NE-Puffer 2)	10 mM Tris-HCl
	10 mM MgCl ₂
	50 mM NaCl
	1 mM DTT

2.3.1 Identifikation der Zielsequenz durch DNA-Sequenzierung

Zur Identifizierung der Genfragmente wurde die isolierte Plasmid-DNA nach einer modifizierten Methode gemäß Sanger [44] mittels PCR sequenziert. Die Sequenzierung wurde mit einem ABI-Sequenzierungssystem von Applied Biosystems durchgeführt. Konzentrationsangaben zu Puffer und Reaktionsmix wurden vom Hersteller nicht gemacht. Die Sequenzierung wurde im Auftragslabor der Firma Solvias Bioanalytik, Basel, Schweiz, durchgeführt.

Durchführung

Das Reaktionsgemisch mit einem Gesamtvolumen von 20 µl bestand aus 1 µg der zu sequenzierenden DNA, 8 µl Half-Term-Puffer, 2 µl BigDye-Reaktionsmix und 1,5 µl T7-Sequenzierungsprimer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', 10 pmol/µl). Die PCR durchlief 35 Zyklen unter folgenden Bedingungen:

Denaturierung: 50 Sekunden bei 96 °C

Hybridisierung der Primer: 50 Sekunden bei 55 °C

Extension: 4 Minuten bei 60 °C

Nach 35 Zyklen wurde ein letzter Extensionsschritt bei 60°C für 7 Minuten durchgeführt. Danach wurde der Reaktionsansatz mit Hilfe des Dye-Ex-Spin-Kits (50) (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und zur Detektion auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

Verwendete Lösungen/Puffer

Half-Term-Puffer:	Tris-HCl, pH 9.0	(keine genaueren Angaben verfügbar)
	MgCl ₂	
BigDye-Reaktionsmix:	A-Dye-Terminator labeled with dichloro[R6G]	
	C-Dye-Terminator labeled with dichloro[ROX]	
	G-Dye-Terminator labeled with dichloro[R110]	
	T-Dye-Terminator labeled with dichloro[TAMRA]	
	Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dITP, dUTP)	
	AmpliAq-DNA-Polymerase, FS	
	MgCl ₂	
	Tris-HCl-Puffer, pH 9.	

2.4 Nachweis der Zielsequenz durch Southern Blotting

Bei der Southern-Hybridisierung [88] werden DNA-Fragmente, die mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, auf eine geeignete Trägermembran übertragen und dort fixiert. Bei dem Transfer der Nukleinsäuren von dem Gel auf die Membran bleibt das Trennmuster der Banden erhalten, d. h., die Membran ist eine Kopie des ursprünglichen Gels. Dieser Southern Blot wird mit einer ³²P-markierten DNA-Sonde hybridisiert. Mittels anschließender Autoradiographie können die Banden, die komplementär zur radioaktiven Sonde waren, detektiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Southern-Analysen durchgeführt, um einen Vertreter der Kv4-Familie auf genomischer Ebene im linksventrikulären Myokard des Schweins aufzuspüren. Die DNA-Sonde war entsprechend der Nukleotidsequenz des aus dem Myokard der Ratte bekannten Kv4.2-Kanals konzipiert.

Durchführung

Nach Elektrophorese der mittels Restriktionsenzymen (BamH I, Roche, Mannheim) gespaltenen DNA wurde das Agarose-Gel für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Denaturierungslösung inkubiert. Das Volumen der

Denaturierungslösung betrug das 5-Fache des Gelvolumens. Das Reaktionsgefäß wurde während der Inkubation sanft geschüttelt. Nach 15 Minuten wurde die Denaturierungslösung ausgetauscht.

Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Neutralisierungslösung. Das Volumen der Neutralisierungslösung betrug das 5-fache des Volumens des Agarose-Gels; während der Inkubation wurde sanft geschüttelt. Nach 15 Minuten wurde die Neutralisierungslösung ausgetauscht. Anschließend wurde mittels Kapillarkräften auf eine Nylonmembran (Stratagene) transferiert. Nach 16 Stunden wurde mit UV-Licht bestrahlt und anschließend für 2 Stunden bei 80 °C inkubiert. Die Southern Blots wurden anschließend 15 Minuten bei 68 °C mit QuikHyp (Stratagene) prähybridisiert. Die Membran wurde nach Zugabe der ³²P-markierten DNA-Sonde in einem Hybaid-Ofen (Labline) bei 68 °C für 1 Stunde unter leichter Rotation hybridisiert. Die hybridisierte Southern-Blot-Membran wurde dreimal bei Raumtemperatur mit 2x Saline-Sodium Phosphate-EDTA-Puffer (SSPE) und 0,1 % SDS aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung bei 60 °C für 30 Minuten mit 0,1x SSPE und 0,1 % SDS. Nach dem Reinigungsprozess wurde die Membran für 2 Tage auf einen Röntgenfilm gelegt, wobei Verstärkerfolie zum Einsatz kam. Die Sequenz der eingesetzten DNA-Sonde zur Detektion von Kv4.2 war 5'-GCTACCCGTGCCTGTGATCGTG-3' (1748–1769).

Verwendete Lösungen

Denaturierungslösung:	1,0 N NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung:	1,0 M Tris (pH 7,5) 3 M NaCl
2x SSPE :	20 mM Natriumdihydrogenphosphat / NaOH pH 7,4 0,3 M Natriumchlorid 2 mM EDTA

2.5 Methoden zur Darstellung des 3'- und 5'-Endes der Zielsequenz

Um die Sequenz in Richtung 3'- und 5'-Ende darzustellen, wurden jeweils PCR-Amplifikationen mit verschiedenen Primerpaaren durchgeführt. Mit jedem Primerpaar wurden Amplifikationsreaktionen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt, um die Annealing-Temperatur herauszufinden. Dabei wurde ein Temperaturbereich von 46 bis 60 °C in Schritten von 2 °C durchlaufen. Mittels Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte jeweils auf die erwartete Länge geprüft. Bei Nachweis einer entsprechenden Bande wurde eine Sequenzierung des PCR-Produktes durchgeführt. Zeigte die Sequenzierung neue Abschnitte der Zielsequenz, konnten neue Primer konstruiert werden, mit denen dann erneut Amplifikationen durchgeführt wurden. Die Amplifikationen wurden so lange fortgesetzt bis das Start-Codon und ein Stop-Codon gefunden wurden. Auf mRNA-Ebene kodiert das Triplet AUG sowohl als Codon für Methionin als auch als Startsignal der Translation, es wird daher auch als Start-Codon bezeichnet. Die Translation stoppt an den Basentripletts UGA, UAA oder UAG. Auf DNA-Ebene entspricht das Start-Codon dem Basentriplett ATG und die Stop-Codons entsprechen den Basentripletts TAA, TGA und TAG.

2.5.1 Amplifikation des 3'-Endes der cDNA mittels RACE-PCR

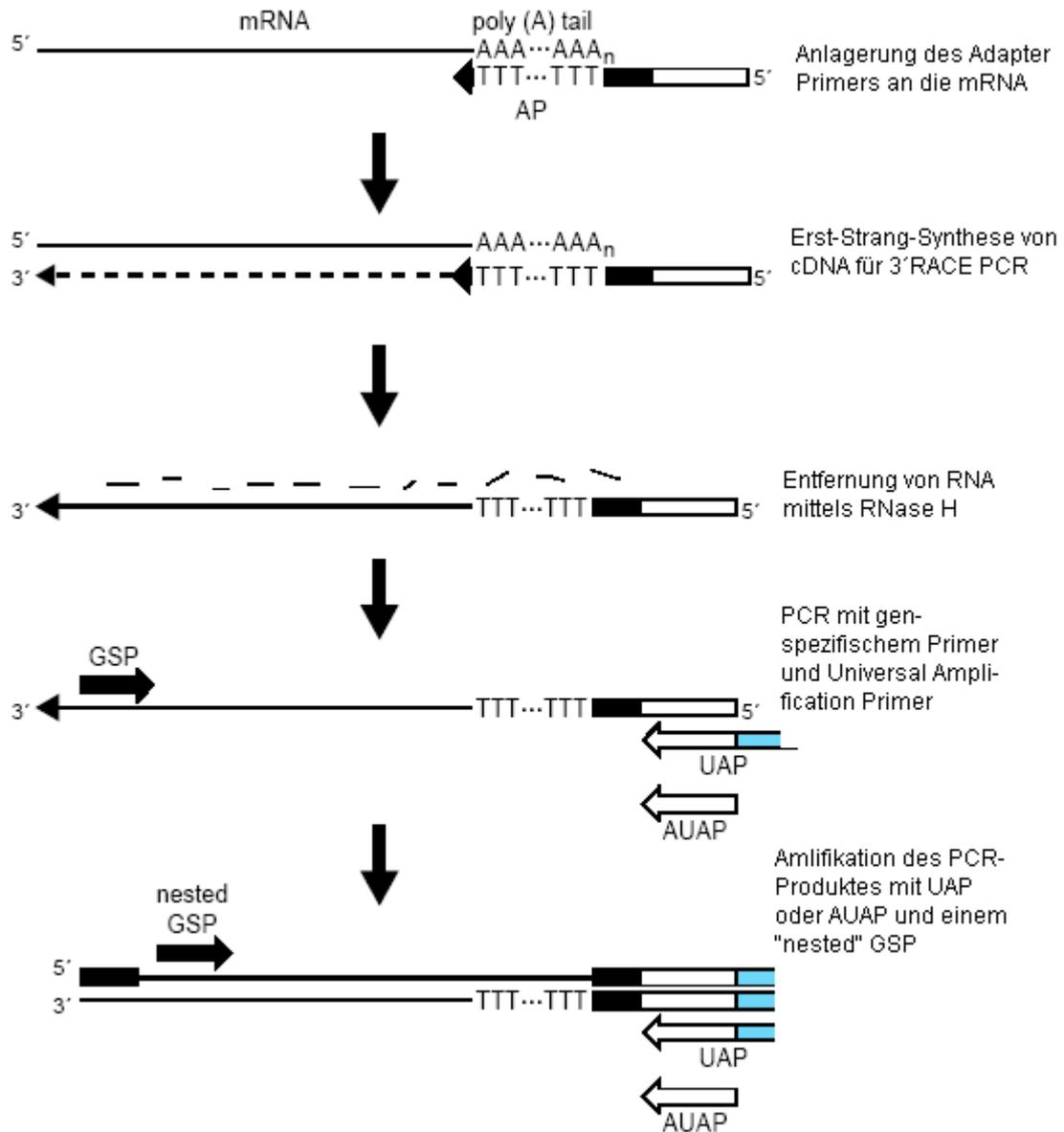


Abbildung 5: Übersicht über das 3'-RACE-Verfahren [Quelle: Invitrogen]

2.5.1.1 Herstellung von Erst-Strang-cDNA für eine 3'-RACE-PCR

Die Synthese von cDNA für die 3'-PCR aus der aus dem Schweineherzen isolierten RNA wurde nach dem von Lee und Caskey [53] beschriebenen Verfahren durchgeführt. Da fast bei der gesamten RNA aus Eukaryonten am 3'-Ende Poly-A-Sequenzen gefunden werden [28], wurde ein Primer (Adapter Primer) gewählt, der an diese Stelle bindet. Der Adapter Primer (AP) war mit einer kurzen Nukleotidsequenz verknüpft. Um die Spezifität der cDNA zu erhöhen, wurde im weiteren Verlauf anstelle des AP mit einem genspezifischen Primer (GSP) gearbeitet. Dieser wurde so konstruiert, dass er sich an bekannte Sequenzen anlagerte. Bei der Verwendung des Adapter Primers lag nach Umschreiben mittels Reverser Transkriptase ein DNA-Fragment mit einem Poly-T-Stück am 5'-Ende vor. Dem Poly-T-Stück schloss sich die mit dem Adapter Primer vergesellschaftete komplementäre Nukleotidsequenz an. Abschließend wurde durch RNase H die RNA der zuvor gebildeten DNA-RNA-Hybrid-Doppelstränge zerstört, so dass die synthetisierte cDNA in Einzelsträngen vorlag. Die verwendeten Lösungen/Reagenzien, mit Ausnahme der genspezifischen Primer, waren aus dem Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis der Firma Life Technologies.

Durchführung

Zu 4 µg, in einem Eppendorf-Gefäß A gelöster RNA, wurde 1 µl AP (10 µM) oder GSP hinzugegeben und mit DPEC-Wasser ad 11 µl aufgefüllt. Durch vorsichtiges Aufnehmen und Abgeben mit einer Pipette wurde der Reaktionsansatz gemischt. Anschließend wurde für 20 Sekunden mit 4000 rpm zentrifugiert, um den Gefäßinhalt am Boden zu sammeln. Es wurde für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert (Thermoblock, Biometra), um die RNA zu denaturieren. Während der Inkubation wurde in einem separaten Eppendorf-Gefäß B eine Lösung mit 7 µl Volumen angesetzt. Es wurde streng auf die angegebene Reihenfolge geachtet. Nacheinander wurden 2 µl 10x PCR-Puffer, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 2 µl DTT (0,1 M)

zugegeben. Nach Beendigung der Inkubation folgte eine Zentrifugation (Biofuge pico, Heraeus) von 10 Sekunden mit 4000 rpm, um den Gefäßinhalt am Boden zu sammeln. Anschließend wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes B in das Reaktionsgefäß A gegeben. Das Gesamtvolumen betrug jetzt 18 µl. Danach wurde für 20 Sekunden sanft von Hand gemischt und für 10 Sekunden mit 4000 rpm zentrifugiert, um den Inhalt wieder am Gefäßboden zu sammeln. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 42 °C (Thermoblock, Biometra) wurde 1 µl SuperscriptII (200 U/µl), was dem Enzym Reverse Transkriptase entspricht, zum Start des Umschreibevorganges zugegeben.

Im Anschluss wurde für 50 Minuten bei 42 °C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, erfolgte eine Inkubation bei 70 °C für 15 Minuten, danach wurde das Reaktionsgefäß für eine Minute auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugation von 10 Sekunden mit 4000 rpm wurde die Lösung mit 1 µl RNase-H (2 U/µl) versetzt und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Quantität und Qualität der in den 20 µl Gesamtvolumen enthaltenen cDNA wurden spektralphotometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech) bestimmt. Die gewonnene cDNA wurde entweder sofort zur PCR eingesetzt oder bei –20 °C gelagert.

Verwendete Primer

1. Adapter Primer (AP): 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)17-3'
AP enthält Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Sal I, Mlu I, und Spe I.
2. Genspezifischer Primer (GSP): Siehe Kapitel 2.6

2.5.1.2 Durchführung einer 3'-RACE-PCR

Das Prinzip der 3'-RACE-PCR besteht in der Amplifikation zwischen einem bekannten Abschnitt einer Sequenz und dem 3'-Ende. Es werden zwei Primer benötigt. Dabei nutzt man zum einen die dem Adapter Primer angelagerte, definierte Nukleotidsequenz. Der Abridged Universal Amplification Primer (AUAP) hat eine zum Adapter Primer homologe Sequenz. Weiterhin wurde ein

sogenannter genspezifischer Primer (GSP) konstruiert, der an einen bekannten Teil der Zielsequenz anlagerte.

Durchführung:

Ein dünnwandiges 0,2-ml-PCR-Gefäß wurde auf Eis gestellt und folgende Komponenten wurden eingebracht: 36,5 µl autoklaviertes Aqua dest., 5 µl 10x PCR-Puffer, 3 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 2 µl der Erst-Strang-cDNA für 3`RACE-PCR. Unmittelbar nach der initialen Denaturierungsphase wurden zu den 47,5 µl Reaktionsansatz 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl), 1 µl AUAP (10 µM) und 1 µl GSP (10 µM) gegeben und mit einer Pipettenspitze wurde vorsichtig umgerührt. Der 10x PCR-Puffer bestand aus 200 mM Tris-HCl (pH 8,4) und 500 mM KCl.

Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug 50 µl. Die Amplifikationsreaktion im Perkin-Elmer-DNA-Thermal-Cycler (GeneAmp-PCR-System 2400) startete mit einer initialen Denaturierungsphase von 5 Minuten bei 94°C. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen der PCR wurde ein „hot start“ durchgeführt [59]. Dabei wurden Taq-Polymerase und Primer erst nach der initialen Denaturierungsphase in das Reaktionsgefäß eingebracht. Das vollständige Vorliegen der DNA in Einzelsträngen bei Zugabe der Primer ermöglicht eine effiziente Bindung der Primer. Weiterhin sollte die Zugabe der Primer in den Reaktionsansatz mit einer Temperatur von 94°C eine gegenseitige Hybridisierung der Primer (Primer-Dimer-Bildung) reduzieren [59]. Indem die Taq-Polymerase erst nach der fünfminütigen Denaturierungsphase bei 94 °C hinzugefügt wurde, wurde versucht, einen Aktivitätsverlust des Enzyms durch zu langes Erhitzen zu verhindern, was vor allem bei längeren Sequenzen von Vorteil ist. Anschließend wurden 35 Zyklen mit je einer Denaturierungsphase von 30 Sekunden, einer Primerhybridisierungsphase von 30 Sekunden und einer Extensionsphase von 40 Sekunden durchlaufen. Die Denaturierung erfolgte bei 94 °C und die Extension bei 72 °C. Die Temperatur für die Hybridisierung der Primer musste für jeden Primer ausgetestet werden. Um das Optimum für die Anlagerung des jeweiligen Primers an die cDNA zu finden, wurde das Temperaturintervall von

48 bis 60°C in Schritten von 1°C durchlaufen, wobei für jeden Schritt eine PCR angesetzt wurde. Mit einer Extensionsphase von 10 Minuten bei 72°C wurde der Amplifikationsprozess beendet. Um Kontaminationen auszuschließen, wurde mit jedem PCR-Ansatz eine Negativkontrolle amplifiziert, die sämtliche für die PCR notwendigen Reagenzien, jedoch keine cDNA enthielt. Mittels Gelelektrophorese wurde der Erfolg der Amplifikation geprüft.

2.5.1.3 Durchführung einer nested 3'-RACE-PCR

Der Adapter Primer bei der cDNA-Synthese lagerte sich an alle polyadenylierten mRNAs im Reaktionsansatz, weshalb die Spezifität der anschließenden PCR-Amplifikation allein vom genspezifischen Primer abhing. Um die Spezifität der amplifizierten DNA zu erhöhen, wurde teilweise eine zweite 3'-PCR durchgeführt. Dabei wurde das PCR-Produkt aus der ersten PCR eingesetzt. Als Primer wurden AUAP (Abridged Universal Amplification Primer) und ein zweiter genspezifischer Primer verwendet, der in Bezug auf den ersten GSP in Richtung 3'-Ende der cDNA lag. Bei Durchführung einer nested 3'-PCR auf Grundlage einer mit einem GSP synthetisierten cDNA wurde statt AUAP ein weiterer GSP verwendet. Der weitere Reaktionsansatz und die Versuchsdurchführung entsprachen denen der 3'-RACE-PCR.

Verwendete Primer

1. Abridged Universal Amplifikation Primer (AUAP):

5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'

AUAP enthält Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Sal I, Mlu I und Spe I.

2. Genspezifischer Primer: Siehe Kapitel 2.6

2.5.2 Amplifikation des 5'-Endes der cDNA mittels RACE-PCR

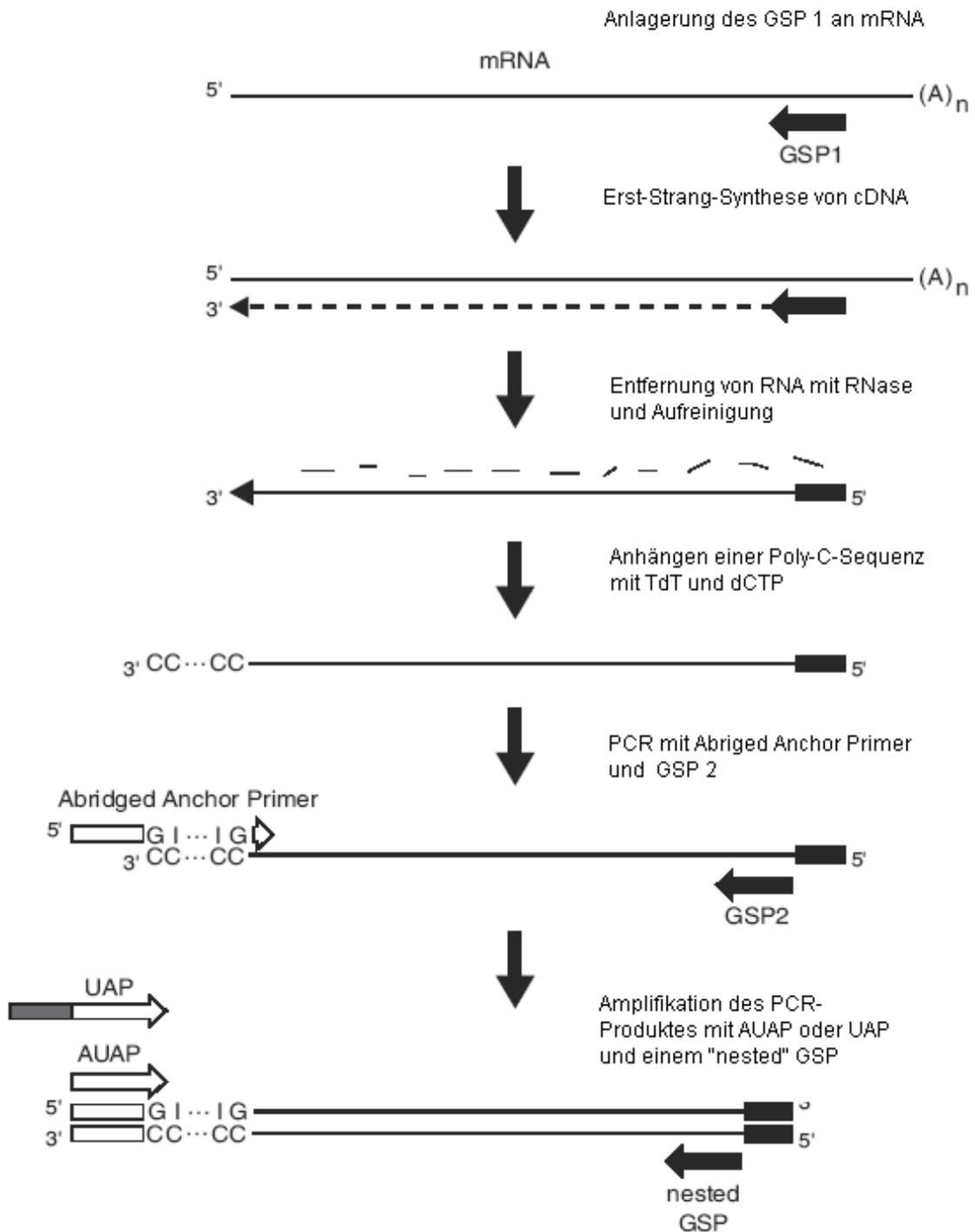


Abbildung 6: Überblick über das 5'-RACE-Verfahren [Quelle: Invitrogen]

2.5.2.1 Erst-Strang-Synthese von cDNA für eine 5'-RACE-PCR

Dieser Vorgang diente dazu, RNA-Sequenzen in cDNA umzuschreiben, die für die 5'-PCR genutzt werden konnte. Die bei diesem Schritt verwendeten Lösungen/Reagenzien waren, mit Ausnahme der genspezifischen Primer, aus dem Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis der Firma Life Technologies. Durch die Verwendung eines genspezifischen Primers (GSP 1) konnte sehr spezifische mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Bei der Konstruktion des GSP 1 wurde darauf geachtet, dass seine Anlagerungsstelle mindestens 300 bp vom 5'-Ende der mRNA entfernt war, um eine optimale Aufreinigung zu ermöglichen. Anschließend wurde durch RNase H die RNA der zuvor gebildeten DNA-RNA-Hybrid-Doppelstränge zerstört, so dass die synthetisierte cDNA in Einzelsträngen vorlag.

Durchführung

Zu 4 µg gelöster RNA in einem Eppendorf-Gefäß A wurden 3 µl GSP 1 hinzugegeben und mit DPEC-Wasser ad 15,5 µl aufgefüllt. Es wurde für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert (Thermoblock, Biometra), um die RNA zu denaturieren. Während der Inkubation wurde in einem separatem Eppendorf-Gefäß B eine Lösung mit 8,5 µl Volumen angesetzt. Es wurde streng auf die angegebene Reihenfolge geachtet. Nacheinander wurden 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 2,5 µl MgCl₂ (25 mM), 1,0 µl dNTP-Mix (10 mM) und 2,5 µl DTT (0,1 M) zugegeben.

Nach Beendigung der Inkubation folgte eine Zentrifugation (Biofuge pico, Heraeus) von 10 Sekunden mit 4000 rpm, um den Gefäßinhalt am Boden zu sammeln. Anschließend wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes B in das Reaktionsgefäß A gegeben. Das Gesamtvolumen betrug jetzt 24 µl. Danach wurden beide Lösungen für 20 Sekunden sanft von Hand gemischt und für 10 Sekunden mit 4000 rpm zentrifugiert, um den Inhalt wieder am Gefäßboden zu sammeln. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 42 °C (Thermoblock, Firma Biometra) wurde 1 µl des Enzyms Reverse Transkriptase (200 U/µl) zum Start des Umschreibevorganges zugegeben. Der Name des Life-Technologies-

Produktes lautete Superscript II. Im Anschluss wurde nochmals bei 42 °C inkubiert, dieses Mal für 50 Minuten. Um die Reaktion zu beenden, erfolgte eine Inkubation bei 70 °C für 15 Minuten, danach wurde das Reaktionsgefäß für eine Minute auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugation von 10 Sekunden mit 4000 rpm wurde die Lösung mit 1 µl RNase H (2 U/µl) versetzt und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Quantität und Qualität der in den 26 µl Gesamtvolumen enthaltenen cDNA wurden spektralphotometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech) bestimmt. Die gewonnene cDNA wurde entweder sofort zur PCR eingesetzt oder bei –20 °C gelagert.

2.5.2.2 Aufreinigung der cDNA für eine 5'-RACE-PCR

Um das Anhängen einer Poly-C-Sequenz an den genspezifischen Primer und damit ein Konkurrieren um den Abridged Anchor Primer während der PCR zu verhindern, musste die Erst-Strang-DNA von überschüssigen Nukleotiden und dem GSP 1 befreit werden. Zur Aufreinigung der cDNA wurde das Glasmax DNA Isolation Spin Cartridge System der Firma GibcoBRL verwendet, aus dem alle in diesem Schritt verwendeten Lösungen, Filtersäulen und Auffanggefäße stammten.

Durchführung

Zu jeder cDNA-Probe wurden 120 µl Binding Solution (Raumtemperatur) zugegeben. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde auf eine Filtersäule umgesetzt. Die Filtersäule war auf ein passendes Auffanggefäß gesteckt. Es wurde für 20 Sekunden mit 12 000 G zentrifugiert (Zentrifuge 5417 C, Eppendorf) und der Durchfluss verworfen. Nachdem 400 µl eiskalter 1-fach-Wash-Puffer auf die Filtersäule gegeben war, wurde erneut für 20 Sekunden mit 12 000 G zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Die Zugabe von Wash-Puffer und das Zentrifugieren wurden insgesamt dreimal durchgeführt. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Im Anschluss wurden 400 µl Ethanol (70 %) auf die Filtersäule gegeben und ebenfalls für 20 Sekunden mit

13 000 G zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt und dann für 1 Minute mit 13 000 G ohne erneute Bestückung der Filtersäule zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Auffanggefäß durch ein Eppendorf-Reaktionsgefäß ersetzt. Anschließend wurden 50 µl 65 °C warmes Aqua dest. auf die Filtersäule gegeben und für 20 Sekunden mit 13 000 G zentrifugiert. Der so gewonnene Durchsatz wurde durch Messung der optischen Dichte (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech) auf seinen Gehalt an DNA untersucht. Bei ausreichender Menge und Reinheit wurde das Filtrat, je nach Zeitpunkt der weiteren Verwendung, auf Eis gestellt oder bei –20°C eingelagert.

2.5.2.3 Hinzufügen einer Poly-C-Sequenz an die cDNA für eine 5'-RACE-PCR

Um eine Bindungsstelle für den Abridged Anchor Primer an der cDNA zu schaffen, wurde mittels Terminal deoxyNukleotidyl Transferase (TdT) eine Poly-C-Sequenz an das 3'-Ende der cDNA angehängt.

Durchführung

Zu 10 µl der aufgereinigten cDNA wurden 6,5 µl DPEC-Wasser, 5 µl 5x Tailing-Puffer und 2,5 µl 2 mM dCTP zugegeben, vorsichtig gemischt und für 3 Minuten bei 94 °C inkubiert (Thermoblock, Biometra). Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für eine Minute auf Eis gestellt und dann 10 Sekunden mit 4000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge 5417 C, Eppendorf), um die 24 µl des Reaktionsansatzes am Gefäßboden zu sammeln. Nach Zugabe von 1 µl TdT wurde durch vorsichtiges Aufziehen in der Pipette gemischt und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 25 µl. Um die Reaktion zu beenden, wurde 10 Minuten bei 65 °C inkubiert (Thermoblock, Biometra). Die Probe wurde für 10 Sekunden mit 4000 rpm zentrifugiert und je nach Erfordernis auf Eis gestellt oder bei –20 °C eingelagert.

Verwendete Puffer/Lösungen

5x tailing-Puffer:	10 mM Tris-HCl
	25 mM KCl
	1,5 mM MgCl ₂
	pH 8,4

2.5.2.4 Durchführung einer 5'-RACE-PCR

Die 5'-RACE-PCR ermöglicht die Darstellung des 5'-Endes einer Sequenz. Dazu wird ein genspezifischer Primer (GSP 2), der sich an eine Sequenz innerhalb des cDNA-Moleküls anlagert, benötigt. Weiterhin ist ein sogenannter Anchor Primer sowie Taq-Polymerase erforderlich. Bei der Konstruktion der Primer wurde darauf geachtet, dass der GSP 2 in Richtung 3'-Ende der cDNA bezüglich des GSP 1 lag. Es wurde das 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends der Firma Life Technologies verwendet.

Durchführung

Ein dünnwandiges 0,2-ml-PCR-Gefäß wurde auf Eis gestellt und folgende Komponenten wurden eingebracht: 31,5 µl autoklaviertes Aqua dest., 5 µl 10x PCR-Puffer, 3 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 2 µl GSP 2, 2 µl Abridged Anchor Primer (10 µM) und 5 µl der Poly-C-cDNA. Unmittelbar vor dem Start der PCR wurden zu den 49,5 µl Reaktionsansatz 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) gegeben und mit einer Pipettenspitze vorsichtig umgerührt. Der 10x PCR-Puffer bestand aus 200 mM Tris-HCl (pH 8,4) und 500 mM KCl. Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug 50 µl. Die Amplifikationsreaktion im Perkin-Elmer-DNA-Thermal-Cycler (GeneAmp-PCR-System 2400) startete mit einer initialen Denaturierungsphase von 5 Minuten bei 94 °C. Anschließend wurden 35 Zyklen mit je einer Denaturierungsphase von 30 Sekunden, einer Primerhybridisierungsphase von 30 Sekunden und einer Extensionsphase von 40 Sekunden durchlaufen. Die Denaturierung erfolgte bei 94 °C und die Extension bei 72 °C. Die Temperatur für die Hybridisierung der Primer musste für jeden Primer ausgetestet werden. Um

das Optimum für die Anlagerung des jeweiligen Primers an die cDNA zu finden, wurde das Temperaturintervall von 48 bis 60 °C in Schritten von 1 °C durchlaufen, wobei für jeden Schritt eine PCR angesetzt wurde. Mit einer Umschreibphase von 10 Minuten bei 72 °C wurde der Amplifikationsprozess beendet. Um Kontaminationen auszuschließen, wurde für jeden PCR-Ansatz eine Negativkontrolle amplifiziert, die sämtliche für die PCR notwendigen Reagenzien, jedoch keine cDNA enthielt. Mittels Gelelektrophorese wurde der Erfolg der Amplifikation geprüft.

2.6 Auflistung der verwendeten Primer für die durchgeführten PCR- und Amplifikationsreaktionen:

Abridged Universal Amplifikation Primer (AUAP):

5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'

AUAP enthält Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Sal I, Mlu I, und Spe I.

Abridged Anchor Primer: 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GG/ /GG
GGG- 3'

uniamp 5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC - 3'

Kv4.4 30 up 19 5'- TGA CCA AGA CCC CGC TCA G- 3'

Kv4.4 pig 36 up 5'- GGC TAT CAT CAT CTT CGC TAC AGT T - 3'

Kv4.4 pig 194 up 5'- TTG GTT CCA TCT GTT CGC TG - 3'

Kv4.4 pig 196 up 5'- GTT CCA TCT GTT CGC TGA GCG -3'

Kv4.4 pig 216 up 21 5'- CGG GGT CTT GGT CAT TGC TTT - 3'

Kv4.4 pig 227 up 5'- TCA TCG CGC TAC CCG TGC CT - 3'

Kv4.4.1 1 up 22 5'- GCA CAA CAC CGG AGA GAG CAC G - 3'

Kv4.4.2 212 up 22 5'- AGG GTT CTT CAT TGC TGT GTC C -3'

Kv4.4.2 283 up 21 5'- ATC CTC AAC TTC TAC CGC ACG -3'

Kv4.4.2 pig 612 up	5'- CTT CTT GCT CTT CTC TCT CAC C – 3'
Kv4.4.2 781 up 21	5'- TTT TTG GTT CCA TCT GTT CG – 3'
Kv4.4.2 814 up	5'- GCG GGG TCT TGG TCA TTG CTT – 3'
Kv4.4.4 up 23	5'- TTG TTT TGA GGG GAG GAA GTG GG- 3'
Kv4.4.4 233 up 22	5'- TTG CTG TGT TCC GTC ATC GCT T – 3'
Kv4.4.6 up 22	5'- GTT TTC CCG CCA CTC TCA AGG- 3'
Kv4.4.6 1 up	5'- ATG GCG GCG GGG GTA GCA GCG TGG- 3'
Kv4.4.6 1 up Bam	5'- GGA TCC ATG GCG GCG GGG GTA GCA- 3'
Kv4.4.6 58 up	5'- GAT CTC TCT GGA CCA CAT TTC TCA C- 3'
Kv4.4.6 490 up	5'- TCC ACT ATC CTC GCC ATG AAT GCA- 3'
Kv4.4.6 947 up	5'- TTT TGT GCG TAG CGT CAT GAG TAT C- 3'
Kv4.4.6 1248 up	5'- CAT CCC TGC TGC CTT CTG GTA CAC C- 3'
Kv4.4.6 1891 up	5'- TGT GTG GAG AGA ACC CCG CTG TC- 3'
Kv4.4 7 lo 22	5'- GAG AGA AGA GCA AGA AGC CCA A – 3'
Kv4.4 88 lo 24	5'- AGG GAT GCT GGT GAA CTT GAT GGC- 3'
Kv4.4 pig 159 lo 21	5'- GTC TTC GGC CAG CAA GTT CAC - 3'
Kv4.4 198 lo 19	5'- GCT CAG CGA ACA GAT GGA A - 3'
Kv4.4.1 88 lo 23	5'- GCA CAA AAC GGT AGC GAC TGG GT - 3'
Kv4.4.1 268 lo 22	5'- CCT CGA CGT GTA CCC CAG GAT G – 3'
Kv4.4.2 77 lo 25	5'- GGT GTT GTC GGT GTC AGC ATC ATC T – 3'
GCA	
Kv4.4.2 117 lo 20	5'- CCG TCA TAG TGG GCA GCG TG – 3'
Kv4.4.2 225 lo16	5'- ATT AGC GAT GAC GGA C – 3'
Kv4.4.2 273 lo	5'- GCA GTT CTT TAA TGT GAC CGG GA – 3'
Kv4.4.4 lo 23	5'- TTC CAC AGC CAG GGT TCA AAT TC - 3'

Kv4.5 up	5'- TTA TCG AYG TGG TGG CCA TC - 3'
Kv4.5	5'- TYA TCG AYG TGG TGG CCA TC - 3'
Kv4.4.6 1 lo	5'- TTA CAA AGC TGA CAC TCT GAC AA- 3'
Kv4.4.6 2 lo	5'- ATT CTT AGA CCT GAT TCC CAC TGT- 3'
Kv4.4.6 198 lo	5'- GCT CAG CGA ACA GAT GGA ACC A- 3'
Kv4.4.6 522 lo	5'- GGG ATG AGG CCA AAG AAG AAG G- 3'
Kv4.4.6 984 lo	5'- GGG CTA CAT TAT TCC GTC CTA CCG- 3'
Kv4.4.6 1877 lo	5'- GAC AGC GGG GTT CTC TCC ACA CA- 3'

2.7 Isolierung und Lagerung von Xenopus-laevis-Oozyten

Die Oozyten wurden aus den Ovarien von weiblichen *Xenopus-laevis*-Fröschen entnommen. Hierzu wurde ein Frosch für 10 Minuten mit einer 0,2 %igen MS-222-Lösung (Firma Sandoz, Basel) anästhesiert. Die MS-222-Lösung war mit NaHCO₃ auf einen pH-Wert von 7 titriert. Die Ovarialsäckchen wurden chirurgisch entfernt und die Oozyten in MBL (modified bath solution) mit Kollagenase A 0,4 U/ml (Firma Serva, Deutschland) für 20 Stunden oder für 6 Stunden mit Kollagenase A 0,8 U/l enzymatisch isoliert. Danach wurden die Oozyten zur Defollikulierung- der Entfernung der drei äußeren Zellschichten- und zur Beendigung der Kollagenaseaktivität für 5 Minuten in kalziumfreie NaCl-95-Lösung gelegt. Schließlich wurden die Oozyten wieder in die MBL überführt. Oozyten des Stadiums V und VI mit gleichmäßiger Färbung [26] wurden zur weiteren Verwendung unter der Stereolupe selektiert. Ständige Bewegung im Schüttler verhinderte in der Zeit bis zur weiteren Verarbeitung Deformierungen und Verklebungen.

2.8 Injektion der cRNA in Xenopus-laevis-Oozyten

Die Kv4-cRNA vom Schwein wurde mit Hilfe eines in drei Ebenen beweglichen Mikromanipulators und eines Nanoliterinjektors unter einem Stereomikroskop

direkt ins Zytoplasma der Oozyten injiziert. Pro Oozyte wurde 1 ng in 50 nl RNase-freiem Wasser gelöste cRNA injiziert. Die beimpften Oozyten wurden in antibiotikahaltiger MBL in Gewebekulturplatten einzeln bei 15 °C unter ständiger Bewegung inkubiert und nach 24 bis 72 Stunden untersucht.

2.9 Elektrophysiologische Methoden

Um den klonierten Kanal funktionell zu charakterisieren, wurden in unserer Abteilung durch Herrn Prof. Dr. Tilmann Volk und Herrn Dipl. Ing. Peter Bassalay elektrophysiologische Untersuchungen an *Xenopus laevis*-Oozyten durchgeführt.

2.9.1 Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode

Durch Unterdruck- oder durch Überdruckpulse ist es möglich, die Membran unter der Öffnung einer Patch-Pipette [33] in der sogenannten cell-attached-Konfiguration zu perforieren. Dadurch gleichen sich die Elektrolytkonzentrationen zwischen Pipette und Zellinnerem aus. Die neue Elektrolytkonzentration wird aufgrund des wesentlich größeren Volumens maßgeblich von der Pipettenlösung bestimmt [58]. Diese Konfiguration wird Ruptured-Patch-Whole-Cell-Konfiguration genannt. Die in dieser Konfiguration gemessenen Ganzzellströme stellen die Summe der Ströme der einzelnen Ionenkanäle dar. In der Regel sind sie so groß, dass die einzelnen Schaltvorgänge in ihnen aufgehen.

Bei der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode wird das Membranpotenzial der Oozyte auf einen vorgegebenen Wert geklemmt [87, 89]. Mit der ersten intrazellulären Elektrode E' wird das aktuelle intrazelluläre Potenzial aufgezeichnet, indem sie das Membranpotenzial gegen eine geerdete extrazelluläre Referenzelektrode, die sogenannte Agarbrücke, misst [2]. Das aktuell gemessene Membranpotenzial wird über den Rückkopplungsverstärker (Gene Clamp Amplifier, Axon Instruments) (FBA) mit dem Sollwert verglichen,

und über die zweite intrazelluläre Elektrode I' wird jeweils so viel Strom appliziert, dass der vorgegebene Wert aufrechterhalten wird [1, 22, 36, 75]. Wird nun eine Substanz elektrogen über die Membran transportiert, ist der Strom, der vom Rückkopplungsverstärker zu applizieren ist, um das geänderte Membranpotenzial wiederaufzubauen, der gemessene Parameter.

2.9.2 Versuchsablauf

Ganzzellströme wurden mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode [Abbildung 7] in der Whole-Cell-Konfiguration aufgezeichnet. Dazu wurde ein Turbo-Tec-05-Verstärker (NPI Electronic, Germany) oder ein OC-725C (Warner, Conn, USA) benutzt, die jeweils über ein ITC-16-Interface (Instrutech Corp., Long Island, N. Y., USA) von Pulse-Software (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) gesteuert wurden. Die Ganzzellmessungen wurde mit Pulse-Fit-Software (HEKA Elektronik, Deutschland) oder IGOR (Wave Metrics, Lake Oswego, OR, USA) ausgewertet. Alle Daten wurden mit 500 Hz gefiltert und mit einem Samplingintervall von 0,5 ms auf Festplatte gespeichert. Der Experimentiertisch war durch mit Luft gefüllte Stoßdämpfer gegen äußere Erschütterungen geschützt und befand sich zur Abschirmung gegen äußere elektrische Störeinflüsse innerhalb eines Faraday'schen Käfigs [67]. Die Zelle befand sich während des Experimentes in einer verlängerten Messkammer mit den Maßen 2,5mm x 20 mm, die kontinuierlich mit einer Flussrate 6 ml/min bei Raumtemperatur (21-23 °C) perfundiert wurde. Die intrazellulären Mikroelektroden wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Clark Elektromedical Instruments, Reading, Großbritannien, Typ GC150TF-15, Außendurchmesser 1,5 mm) im Mikroelektrodenpuller (Modell P-87, Sutter Instruments, USA) zu dünnwandigen Elektrodenpipetten ausgezogen und mit 3 M KCl gefüllt. Die Borosilikatglasröhrchen waren zuvor 4 Stunden bei 200 °C sterilisiert worden. Mit Pipettenlösung gefüllt hatten sie gegenüber der Tyrode-Lösung im Bad einen Pipettenwiderstand von 1 bis 5 M Ω . Über die KCl-Füllung wurde der elektrische Kontakt zu den chloridierten Silberdrahtelektroden hergestellt, die über die HS-2A-Headstages (Fa. Axon

Instruments) mit dem Rückkopplungsverstärker (Gene Clamp 500 Amplifier, Axon Instruments) in Verbindung standen. Am zellabgewandten Teil der Pipetten ragte der Elektrodendraht ca. 3 mm in das Lumen der Pipette hinein. Alle verwendeten intrazellulären Mikroelektroden hatten einen Widerstand zwischen 0.3 und 1,5 M Ω [60,75]. Die extrazelluläre Referenzelektrode, ein Ag-AgCl₂-Draht, stand über eine Brücke aus 3 % Agar und 3 M KCl-Lösung mit dem Bad in Verbindung und hatte die Aufgabe, das Potenzial der Badlösung auf 0 mV zu klemmen [2]. Zusätzlich wurde zur Messung des Badpotenzials, ein zweites Ag-AgCl₂-Pellet neben die Oozyte gebracht, um Probleme durch Serienwiderstände zu verhindern. Mit Hilfe von Mikromanipulatoren wurden die Pipetten unter visueller Kontrolle durch ein Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss) bei 10-facher Vergrößerung an die Zelle herangebracht und vorsichtig auf der Zellmembran aufgesetzt. Beim Aufsetzen der Pipette auf die Zellmembran wurde die Erhöhung des Widerstandes mittels eines akustischen Signals kontrolliert. Durch das Anlegen eines Unterdrucks an die Pipette wurde die Cell-Attached-Konfiguration erreicht. Nach Zerstörung der Zellmembran im Bereich unter der Pipettenspitze durch Druckimpulse war die Ruptured-Patch Whole-Cell-Konfiguration erreicht. Hierbei sind: I der gemessene Strom, und I' die Elektrode, über die der Strom zur Aufrechterhaltung der vorgegebenen Spannung appliziert wird. E' ist die Elektrode, die das Membranpotenzial E misst. FBA (Feed-Back-Amplifier) ist der Rückkopplungsverstärker, der gleichzeitig Spannung und Strom misst und den Haltestrom appliziert [36].

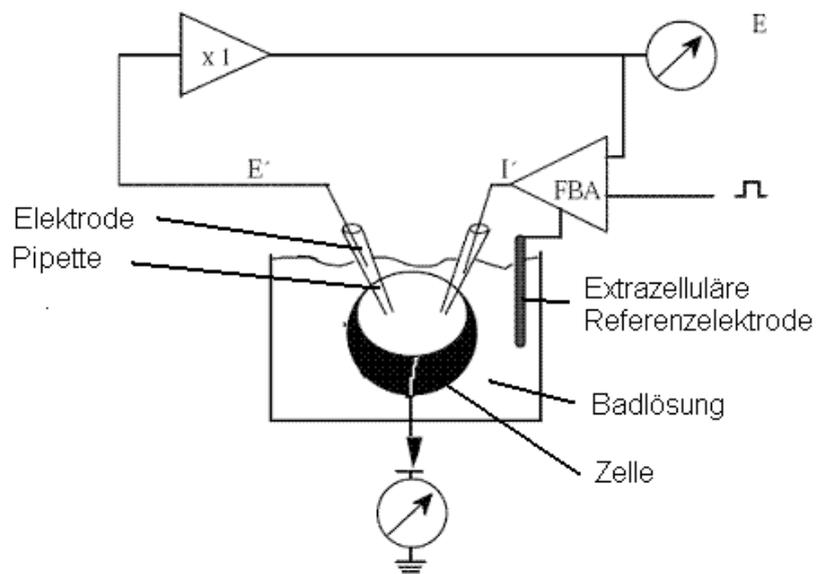


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Messanordnung für Two-Electrode Voltage-Clamp

3. Ergebnisse

3.1 Expressionsnachweis von Kv4- α -mRNA im linksventrikulären Schweinemyokard

Mittels einer PCR, mit Intron überspannenden, degenerierten Primern zur Detektion von Kv4- α -mRNA wurden aus dem linken Ventrikel des Schweineherzens DNA-Fragmente der erwarteten Länge amplifiziert [Abbildung 8].

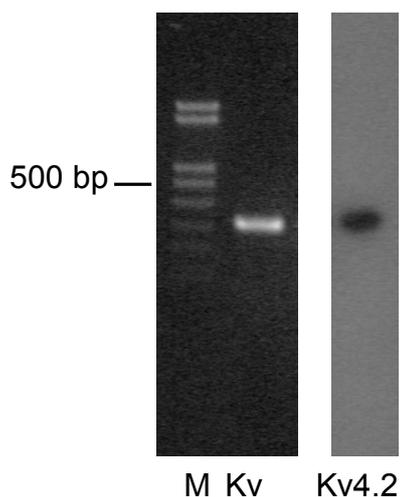


Abbildung 8: PCR-Produkt nach der Amplifikation mit degenerierten Primern, M = Marker, Kv = Fragment aus Schweinemyokard, Kv4.2 =Southern Blotting mittels Kv4.2 Sonde

Die Durchführung eines Southern Blottings mittels einer DNA-Sonde, die entsprechend der Nukleotidsequenz des Kv4.2-Kaliumkanals bei der Ratte konzipiert war, zeigte ein positives Signal. Die Sequenzierung der Nukleotide des Fragmentes ließ keine eindeutige Zuordnung zu den Nukleotidsequenzen

bekannter Vertreter der Kv4-Kaliumkanal-Familie (Kv4.1, Kv4.2, Kv4.3) anderer Spezies (z. B. Ratte, Mensch) zu. Die größte Übereinstimmung der Nukleotidsequenz bestand jedoch mit der des Kv4.2 der Ratte.

Eine gezielte Suche mittels Kv4.1- und Kv4.3-spezifischen Primern ergab keinen Hinweis auf die Expression beider Gene im myokardialen Gewebe des Schweins. Um eine eindeutige Zuordnung des amplifizierten Fragmentes zu einem Vertreter der Kv4-Kaliumkanal-Familie vornehmen zu können, wurde eine Klonierung in Richtung 3'- und 5'-Ende des Gens durchgeführt.

3.2 Weitere Klonierung des 3'- und 5'-Endes des PCR-Fragmentes:

3.2.1 Schrittweise Identifikation der Nukleotidsequenz durch PCR-Amplifikationen

Um die weitere Nukleotidsequenz des PCR-Fragmentes in Richtung 3'- und 5'-Ende darzustellen, wurden zahlreiche PCR-Amplifikationen mit unterschiedlichen Primerpaaren durchgeführt. Für jedes Primerpaar wurde dabei die optimale Annealing-Temperatur ermittelt. Die im Folgenden aufgelisteten Primerpaare mit den angegebenen Annealing-Temperaturen (AT) führten zu einer schrittweisen Verlängerung der gesuchten Sequenz bis zum Auffinden der Start- und Stop-Codons. Die Reihenfolge der Auflistung stellt die zeitliche Abfolge der durchgeführten Reaktionen dar:

1. 3'-PCR mit KV4.4 pig 216 up 21 und AUAP bei einer AT von 50 °C.
2. 3'-PCR mit Kv4.4 pig 216 up 21 und AUAP bei einer AT von 52 °C.
3. 3'-PCR mit Kv4.4. pig 36 up und AUAP bei einer AT von 50 °C.
4. 3'-PCR mit Kv4.4 pig 36 up und AUAP bei einer AT von 50 °C, anschließend nested 3'-PCR mit Kv4.4 pig 196 up und AUAP bei einer AT von 54 °C mit Hotstart.

5. Erststrang-Synthese von cDNA für 5'-PCR mit Kv4.4 30 up 19 als GSP 1, dann 5'-PCR mit Kv4.4 88 lo 23 als GSP2 bei einer AT von 48 °C mit Hotstart. Anschließend 5'-PCR mit Kv4.4 88 lo 23 als GSP3 bei einer AT von 48 °C und 50 °C.
6. PCR mit Kv4.4.4 233 up und Kv4.4 7 lo 22 bei einer AT von 50 °C.
7. Erststrang-Synthese von cDNA für 5'-PCR mit Kv4.4 7 lo 22 als GSP1, dann 5'-PCR mit Kv4.4.1 268 lo 22 als GSP2 bei einer AT von 48 °C. Anschließend 5'-PCR mit Kv4.4.1 88 lo 23 als GSP 3 bei einer AT von 48 °C mit Taq Polymerase Platinum.
8. 3'-PCR mit Kv4.4. 159 lo 21 und AUAP bei einer AT von 50 °C mit Hotstart.
9. 3'-PCR mit Kv4.4 159 lo 21 und AUAP bei einer AT von 56 °C.
10. 3'-PCR mit Kv4.4.1 1 up 22 und AUAP bei einer AT von 54 °C. Das PCR-Produkt wurde als Ausgangsmaterial für eine nested 3'-PCR mit Kv 4.4 pig 194 up und AUAP bei einer AT von 60 ° eingesetzt.
11. 3'-PCR mit Kv4.4 pig 194 up und AUAP bei einer AT von 60 °C.
12. Erststrang-Synthese von cDNA für 5'-PCR mit Kv4.4 30 up 19 als GSP1, dann 5'-PCR mit Kv4.4 7 lo 22 als GSP2 bei einer AT von 56 °C. Anschließend 5'-PCR mit KV 4.4.1 268 lo 22 als GSP3 bei einer AT von 50 °C und 54 °C.
13. Erststrang-Synthese von cDNA für 5'-PCR mit Kv4.4 30 up 19 als GSP1, dann 5'-PCR mit Kv4.4 7 lo 22 als GSP2 bei einer AT von 56 °C. Anschließend 5'-PCR mit KV4.4.1. 88 lo 23 als GSP3 bei einer AT von 48 °C.
14. 3'-PCR mit Kv4.4 pig 216 up 21 und AUAP bei einer AT von 52 °C und 54 °C mit Hotstart.
15. 3'-PCR mit Kv4.4 pig 194 up und AUAP bei einer AT von 60 °C, anschließend nested 3'-PCR mit Kv4.4 pig 216 up 21 und AUAP bei einer AT von 56 °C.

16. Erststrang-Synthese von cDNA für 5'-PCR mit Kv4.4 7 lo 22 als GSP1, dann 5'-PCR mit Kv4.4.1 268 lo 22 als GSP2 bei einer AT von 50 °C. Anschließend 5'-PCR mit Kv4.4.2 273 lo als GSP3 bei einer AT von 50 °C und 52 °C.
17. Erststrang-Synthese von cDNA für 5'-PCR mit Kv4.4 7 lo 22 als GSP1, dann 5'-PCR mit Kv4.4.1 268 lo 22 als GSP2 bei einer At VON 50 °C. Anschließend 5'-PCR mit Kv4.4.2 77 lo 25 als GSP3 bei einer AT von 50 °C und 52 °C.
18. Erststrang-Synthese von cDNA für 5'-PCR mit Kv4.4 30 up 19 als GSP1, dann 5'-PCR mit Kv4.4.2 225 lo 16 als GSP2 bei einer AT von 50 °C. Anschließend 5'-PCR mit Kv4.4.2 117 lo 20 als GSP3 bei einer AT von 60 °C.
19. Erststrang-Synthese von cDNA für 5'-PCR mit Kv 4.4 30 up 19 als GSP1, dann 5'-PCR mit Kv4.4.2 225 lo 16 als GSP2 bei einer AT von 50 °C. Anschließend 5'-PCR mit Kv4.4.2 77 lo 25 als GSP3 bei einer AT von 60 °C.
20. PCR mit Kv4.4.4 23 up und Kv4.4 7 lo 22 bei einer AT von 55 °C.
21. PCR mit Kv4.4.4 233 up und Kv4.4.4 lo 23 bei einer AT von 55 °C.
22. PCR mit Kv4.4.6 22 up und Kv4.4.6 198 lo bei einer AT von 56 °C.
23. PCR mit Kv4.4.4 23 up und Kv4.4.6 198 lo bei einer AT von 56 °C.
24. PCR mit Kv4.4.4 23 up und Kv4.4 88 lo 24 bei einer AT von 56 °C.
25. PCR mit Kv4.4.6 1 up Bam und Kv4.4 198 lo bei einer AT von 56 °C.
26. PCR mit Kv4.4.6 58 up und Kv4.4 198 lo bei einer AT von 56 °C.
27. PCR mit Kv4.4.2 212 up 22 und Kv4.4.4 lo 23 bei einer AT von 64 °C.
28. PCR mit Kv4.4.6 947 up und Kv4.4.6 1877 lo bei einer AT von 54 °C.
29. PCR mit Kv4.4.6 58 up und Kv4.4.6 1 lo bei einer AT von 54 °C.
30. PCR mit Kv 4.4.2 212 up 22 und Kv 4.4.1 23 lo bei einer AT von 54 °C.
31. PCR mit Kv 4.4.2 814 up und Kv 4.4.6 1 lo bei einer AT von 54 °C.
32. PCR mit Kv 4.4.6 1 up Bam und Kv 4.4 7 lo 22 bei einer AT von 54 °C
33. PCR mit Kv4.4.2 212 up 22 und Kv4.4.6 1 lo bei einer AT von 58 °C.
34. PCR mit Kv4.4.6 1 up Bam und Kv4.4 7 22 lo bei einer AT von 60 °C.
35. PCR mit Kv4.4.6 1 up und Kv4.4.6 1877 lo bei einer AT von 60 °C.

36. Transkription der cDNA mit Kv4.4.6 1 lo, dann PCR mit Kv4.4.6 1 up Bam und Kv4.4.4 lo 23 bei einer AT von 54 °C.
37. Transkription der cDNA mit Kv4.4.6 1 lo, dann PCR mit Kv4.4.6 58 up und Kv4.4.4 lo 23 bei einer AT von 52 °C.

3.2.2 Amplifikation des Gesamtklons (full length clone)

Das Auffinden der Start- und Stop-Codons ermöglichte die Konzeption von genspezifischen Primerpaaren und die Amplifikation des Gesamtklons (full length clone) [Abbildung 9]. Die erfolgreiche Amplifikation des Gesamtklons aus linksventrikulärem Herzgewebe des Schweins erfolgte mittels einer nested PCR unter Verwendung folgender genspezifischer Primer:

Kv4.4.6 1 up und Kv4.4.6 2 lo bei einer AT von 60°C [siehe Kapitel 2.6].

Das für die nested PCR eingesetzte DNA-Template (1:1000-Verdünnung) entstammte einer PCR-Amplifikation mit den folgenden genspezifischen Primern:

Kv4.4.6 1 up Bam und Kv4.4.6 1 lo bei einer AT von 57°C [siehe Kapitel 2.6].

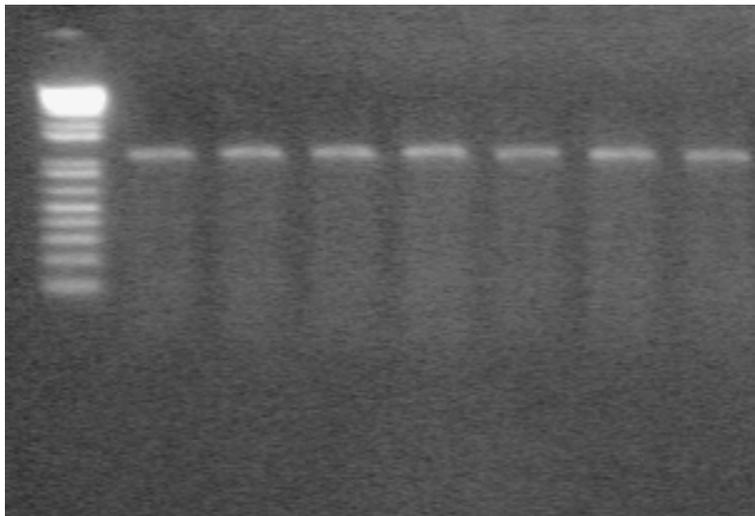


Abbildung 9: Amplifikation des Full length Klones

3.3 Identifikation der Nukleotidsequenz aus dem linksventrikulären Schweinemyokard

Nach der Darstellung der Gesamtsequenz aus dem linken Ventrikel des Schweinemyokards erfolgte zur weiteren Identifikation ein Vergleich der amplifizierten Nukleotidsequenz aus dem Schwein mit den Nukleotidsequenzen bekannter Vertreter des Kv4.2-Kanals des Menschen und der Ratte.

3.3.1 Nukleotidsequenz des Gesamtklons

Die amplifizierte Sequenz aus dem linksventrikulären Myokardgewebe des Schweins amplifizierten Gesamtklons hatte eine Länge von 2341 Basenpaaren. Im Folgenden wird die Nukleotidsequenz der codierenden Region dargestellt. Start-Codon (ATG) und Stop-Codon (TAA) wurden unterstrichen:

```
ATGGCGGCGGGGGTAGCAGCGTGGCTGCCCTTTGCAAGGGCAGCGGCCATTGGGGATG  
CCTGTGGCCTCGGGGCCCATGCCAGCTCCCCAAGGCAGGAGAGGAAAAGGACTCGAT  
GCCCTAATTGCGCTGAATGTGAGTGGCACCCGTTTCCAGACATGGCAGGACACTCTGA  
ACGTTACCCAGACACTCTGCTGGGCAGTTCTGAGAGGGACTTTTTCTACCATCCAGAG  
ACTCAGCATATTTTTTTGACCGTGACCCAGACATCTTCCGCCACATCCTGAATTTCTA  
CCGCACTGGAAGCTCCACTATCCTCGCCATGAATGCATCTCAGCTTATGATGAGAATT  
GGCCTTCTTTGGCCTCATCCCAGAAATTATTGGCGACTGCTGTTATGAGGAGTCAAGG  
ATCGGAGGCGAGAGAACGCGGAGCGTCTTCAAGATGATGCTGACACCGACACACCGGA  
GAGAGCACGCTGCCACTATGACGGCTCGGCAGAGGGTCTGGCGGGCGTTTGGAAACC  
CCACACCAGCACGATGGCCCTGGTGTCTACTATGTCACAGGGTTCTCATTGCTGTGT  
CCGTCATCGCTAATGTGGTAGAAACAGTGCCGTGTGGGTCTAGTCCCGGTCACATTAA  
AGA ACTGCCCTGTGGGGAACGTATGCGGTGGCCTTCTTCTGCCTGGATACAGCCTGCG  
TCATGATCTTACGGTTGATACTTGCTTCGCCTGGCGGCAGCACCCAGTCGCTACCGT  
TTTGTGCGTAGCGTCATGATATCATCGACGTGGTGGCATCCTGCCTTATTACATCGGG
```

CTGGTGATGACGGACAATGAGGATGTCAGTGGCGCCTTTGCACACTCCGAGTCTTCCG
GGTCTTCCGGATCTTTAAGTTTTCCCGCCACTCCAAGGCCTGCGCATCCTGGGGTACA
CGCTGAAGAGCTGTGCCTCGGAATTGGGCTTCTTGCTCTTCTCTCCACCATGGCTATC
ATCATCTTCGCTACAGTTATGTTCTACGCAGAGAAGGGGTCTTCGGCAGCAAGTTCAC
CAGCATCCCTGCTGCCTTCTGGTACACCATCGTCACCATGACAACACTAGGTATGGTG
ACATGGTACCAAAAACCATAGCAGGGAAGATTTTTGGTTCCATCTGTTTCGCGAGCGG
GGTCTTGGTCATTGCTTTACCTGTCCCAGTGATTGTATCCAAC TTCAGTCGGATCTAC
CACAGAATCAACGAGCAGACAAACGGAGAGCACAAAAGGAAGCCAGACTGGCCAGAAT
CCGGCAGCCAAAAGCGGAAGTGCAAACGCTTACATGCAGAGCAAACGGAACGGCCTAC
TCAGTAACAGCTACAGTCCTCTGAGGATGAGCAGGCCTTTGTTAGCAAATCCGGATCC
AGCTTTGAACCCAGCACCACCACCTGCTCCACTGCCTGGAAAAAACACGAATCACGA
GTTTGTGGATGACAAGTCTTTGAAGAAAGCTGCATGGAAGTCGCCACAGTTAATCGTC
CTTCAAGTCCAGCCCCTCTCTCTTTCACAACAAGGAGTCACCAGCACTTGCTGTTCA
AGACGACACAAAAA ACTTTCCGCATTCCAAATGCCAATGTATCAGGAAGCCACCGAGG
CAGCGTGCAGGAACCAGCACGATTCAGATTAGATGTGTGGAGAGAACCCCGCTGTCTA
ACAGCCGATCCAGTTTAAATGCCAATGGAAGAGTGC GTTAAACTAACTGTGAACAA
CCTTATGTGACTACAGCAATAATAACATCCCAACACCTCCAGTAACCACCCCTGAAGG
CGATGACAGGCCAGAATCTCCGAGTACTCAGAGACAATATTGTCAGAGTGTGAGCTT
TGTAAGACAGTGGGAATCAGGTCTAAGAATTGAACCCCTGGCTGTGGAAAGAATCCNA
CGTGGAAAGAAAGAAGAANCCAGAAACGTGTTGCAGCCAAAACGCCAGAGAAAGAAGGT
TGGTAGTGAGACAGAACC AAAACTTCCAGACTTGAGGACGGAACAAAACCACCAAATG
GCATTTCTAGACAGAGTTGGACCTATTATACAGAGAATAATCTGTGGTCTTTGACTT
TGTGAATGAGCACAATGAAATGCCGCCTATTGATGCTTCTATGATCAGAACTCTTTTT
TAATACAAAAAATAAAATGAATCTTTGAACAGAAGGTCCAGTTGAATGCAAACAAAC
AAAAAAATACGGAAAACATTTTGATAAAAATTTTTCCNGTTAAAACCATAACATNGG
CTAGGGTGAAGATTATTACATACTTAAAAAAAAAAAAAAAAA

3.3.2 Vergleich mit der Nukleotidsequenz des Kv4.2 Kaliumkanals der Ratte

Die Gesamtlänge der amplifizierten Schweinsequenz war mit 2341 Basenpaaren nur unwesentlich länger als die der Nukleotidsequenz des Kv4.2


```

                1210                1230                1250
R  CCGTGCCTGTGATCGTGTCTAACTTCAGTCGGATCTACCACCAAAACCAACGAGCGGAC
   ::X::X::X:::X::X::X:::X::X::X:::X::X::X:::X::X:::X:::
S  CCTGTCCCAGTGATTGTAATCCAACCTTCAGTCGGATCTACCACCAGAATCAACGAGCAGAC
                1210                1230                1250

                1270                1290                1310
R  AAACGAAGGGCACAGAAGAAAGCGAGGCTGGCCAGGATCCGGGCAGCCAAAAGTGGAAGT
   :::X::X:::X:::X:::X:::X:::X:::X:::X:::X:::X:::X:::
S  AAACGGAGAGCACAAAGGAAGCCAGACTGGCCAGAATCCGGGCAGCCAAAAGCGGAAGT
                1270                1290                1310

                1330                1350                1370
R  GCAAAATGCCTACATGCAGAGCAAAGCGGAATGGGTACTGAGCAACCAACTGCAGTCCTCG
   :::X::X:::X:::X:::X:::X:::X:::XX:::X::X:::X::X:::X:::
S  GCAAAACGCTTACATGCAGAGCAAACCGGAACGGCCTACTCAGTAACCAAGCTACAGTCCTCT
                1330                1350                1370

                1390                1410                1430
R  GAGGATGAACCGGCCTTCGTTAGCAAATCTGGATCCAGCTTCGAGACAACACCACCAC--
   :::X::X:::X:::X:::X:::X:::X:::XX::X:XX::X:::X:::
S  GAGGATGAGCAGGCCTTTGTTAGCAAATCCGGATCCAGCTTTGAACCCAGCACCACCAC
                1390                1410                1430

                1450                1470
R  CTGCTTCACTGCCTGGAGAAAACCACGAACCATGA
   :::X:::X:::X:::X:::X:::X:::
S  CTGCTTCACTGCCTGGAAAACCACGAATCACGA
                1450                1470

```

3.3.3 Vergleich mit der Nukleotidsequenz des Kv4.2 Kaliumkanals des Menschen

Auch gegenüber der Gesamtlänge des Kv4.2 des Menschen (NCBI-Accession: NM 204279) mit 2281 Basenpaaren war die aus dem Myokard des Schweins amplifizierte Kv4-Sequenz mit 2341 Basenpaaren nur unwesentlich länger. Ein Vergleich der codierenden Region der Nukleotidsequenz des Kv4.2 des Menschen [41] mit der des aus dem Herzgewebe des Schweins amplifizierten Klons ergab eine Übereinstimmung von 75,7 %. Im Folgenden

werden die Bereiche der codierenden Region der Nukleotidsequenzen des Menschen (M) und des Schweins (S) gegenübergestellt. Übereinstimmungen wurden mit „:“, Unterschiede mit „X“ markiert:

```

      10              30              50
M ATGGCGGCGGGGGTGGCAGCGTGGCTGCCTTTTGAAGGGCAGCGGCTATCGGGGTGGATG
  :::::::::::::::X:::::::::::::::X:::::::::::::::X::X:::::::::::::::
S ATGGCGGCGGGGGTAGCAGCGTGGCTGCCCTTTGAAGGGCAGCGGCCATTGGGTGGATG
      10              30              50

```

```

      70              90              110
M CCTGTGGCCTCGGGGCCTATGCCGGCTCCCCGAGGCAGGAGAGGAAAAGGACCCAAGAT
  :::::::::::::::X:::::::X:::::::X:::::::X:::::::X::X:::
S CCTGTGGCCTCGGGGCCCATGCCAGCTCCCCAAGGCAGGAGAGGAAAAGGACTTCAGGAT
      70              90              110

```

```

     130              150              170
M GCTCTCATTTGTGCTGAATGTGAGTGGCACCCGCTTCCAGACGTGGCAGGACACCCTGGAA
  ::X::X:::X:::::::X:::::::X:::::::X:::::::X:::::::
S GCCCTAAATTGCGCTGAATGTGAGTGGCACCCGTTTCCAGACATGGCAGGACACTTCTGGAA
     130              150              170

```

```

     190              210              230
M CGTTACCCAGACACTCTACTGGGCAGTTCTGAGAGGGACTTTTTCTACCCCAGAAACT
  :::::::::::::::X:::::::X:::::::X:::::::X:::::::X:::
S CGTTACCCAGACACTCTGCTGGGCAGTTCTGAGAGGGACTTTTTCTACCTCCAGAGACT
     190              210              230

```

```

     250              270              290
M CAGCAGTATTTCTTTGACCGTGACCCAGACATCTCCGCCACATCCTGAATTTCTACCGC
  :::::::::::::::X:::::::X:::::::X:::::::X:::::::X:::
S CAGCAGTATTTTTTTGACCGTGACCCAGACATCTCCGCCACATCCTGAATTTCTACCGC
     250              270              290

```

```

     310              330              350
M ACTGGGAAGCTCCACTATCCTCGCCACGAGTGCATCTCTTGCTTACGATGAAGAACTGGCC
  :::::::::::::::X::X:::::::X:::::::X:::::::X:::::::X:::
S ACTGGGAAGCTCCACTATCCTCGCCATGAATGCATCTCAGCTTATGATGAAGAATGGCC
     310              330              350

```


3.3.4 Vergleich der Aminosäuresequenzen vom Kv4.2 der Ratte, des Kv4.2 des Menschen und der amplifizierten Schweinsequenz

Die Gesamtlänge der Aminosäuresequenz des Schweins ist identisch mit der des menschlichen Kv4.2 (NCBI-Accession: CAB56841) und des Kv4.2 der Ratte (NCBI-Accession: NP 113918). Die Aminosäuresequenz der Kv4- α -Untereinheit aus dem linken Ventrikel des Schweinemyokards zeigt eine größere Übereinstimmung mit der des Kv4.2 der Ratte [72] (etwa 96 % Übereinstimmung) und des Menschen [41] (etwa 99 % Übereinstimmung) als mit der Aminosäuresequenz der entsprechenden Vertretern von Kv4.3 (etwa 74 % Übereinstimmung). An Position 43 steht bei der amplifizierten Sequenz des Schweins die Aminosäure Alanin, beim Kv4.2 des Menschen und beim Kv4.2 der Ratte Valin. Schweinesequenz und Kv4.2 des Menschen haben an Position 122 die Aminosäure Phenylalanin, beim Kv4.2 der Ratte ist es Prolin. An Position 156 steht bei der Schweinsequenz und beim Kv4.2 der Ratte die Aminosäure Asparagin, beim Kv4.2 des Menschen Threonin. An Position 157 steht bei der Schweinesequenz und beim Kv4.2 der Ratte Threonin, beim Kv4.2 des Menschen die Aminosäure Alanin. An Position 161 steht bei der Sequenz von Kv4.2 der Ratte und des Menschen Alanin, bei der Sequenz vom Schwein steht Threonin. An Position 427 steht beim Schwein die Aminosäure Glutamin, beim Menschen und bei der Ratte Lysin. Der Austausch dieser Aminosäuren bewirkt eine Ladungsverschiebung an dieser Stelle. Das Schwein trägt an Position 161 die Aminosäure Threonin, bei Mensch und Ratte ist es jeweils Alanin. An Position 427 steht bei der Schweinsequenz die Aminosäure Glutamin, bei den Kv4.2-Sequenzen des Menschen und der Ratte jeweils Lysin. An der Position 464 steht beim Kv4.2 des Menschen und bei der Schweinsequenz Glutamin, bei der Ratte steht Prolin. Weiterhin unterscheidet sich die Aminosäure an Position 622 des Kv4.2 der Ratte (Glycin) von der des Kv4.2 des Menschen und der Schweinsequenz (Asparaginsäure).

Der Vergleich der Aminosäuresequenz des Kv4.2 des Menschen und der Schweinsequenz ergibt einen Austausch von insgesamt fünf Aminosäuren; die Sequenz des Kv4.2-Kanals der Ratte unterscheidet sich durch den Austausch von sieben Aminosäuren von der amplifizierte Sequenz des Schweins. Kein Austausch hatte Auswirkungen auf eine Phosphorylation Consensus Site (▼). Zwischen S1 und S6 sind die Sequenzen aller Spezies konstant. Im Bereich der Tetramerisierungsdomäne (T1) steht bei der Schweinsequenz die Aminosäure Alanin, bei Mensch und Ratte steht Valin. Dargestellt wurde die Aminosäuresequenz von der amplifizierte Sequenz des Schweins (S). Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz vom Kv4.2 des Menschen (M) oder Kv4.2 der Ratte (R) wurden mit einem „.“ gekennzeichnet. Bei Unterschieden gegenüber der Schweinsequenz wurde die jeweils ausgetauschte Aminosäure angegeben.

▼

S	MAAGVAAWLPFARAAAIGWMPVASGPMPPRQERKRTQD AL IA LN VSGTRFQ TW
M V
R V

54

T1

S	QDTLERYPD T LLGSSERDFFYHPETQ Q YFFDRDPDIFR H ILNFYRTG K LHYP R HE
M
R

110

S	CISAYDEELAF F GLIPEIIGDCCYEEYKDRRRE NA ERLQDDAD T D NT G E ST L P T M
M TA ... A
R P A

165

S1

S	TARQ R VWRAFENP H TST M ALVFY Y VTG F FI A SV I AN V V E T V PC G SS P GH I K E L P
M
R

220

4. Diskussion

4.1 Expression des Kv4.2 im linken Ventrikel des Schweineherzens

Entsprechend den von uns vorgelegten Klonierungsarbeiten sind Kv4-Untereinheiten, die als morphologisches Korrelat für den I_{to1} angesehen werden, im Schweinemyokard exprimiert. Li et al. bestreiten nicht nur die Expression des I_{to1} , sondern auch die der Kv4-Untereinheiten im linken Ventrikel beim Schwein [55]. Die durchgeführten Western-Blotting-Arbeiten hatten bei Li et al. kein positives Signal ergeben. Der Grund für den fehlenden Expressionsnachweis per Western Blotting bleibt letztlich unklar. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass Li et al. einen Antikörper verwendeten, der zunächst entsprechend den Angaben zur Detektion von Kv4-Kanal-Proteinen an Rattengewebe entwickelt wurde, der aber unter den verwendeten Versuchsbedingungen möglicherweise eine geringere Affinität zu den im Schweinegewebe exprimierten Kv4-Kanal-Proteinen hat.

4.2 Sequenz von Kv4 im Schweineherzen

Der Vergleich der Aminosäuresequenz des Kv4.2 des Menschen und der des Kv4.2 des Schweins ergab einen Austausch von insgesamt fünf Aminosäuren. Vier der ausgetauschten Aminosäuren befanden sich in der N-terminalen Region und eine befand sich in der C-terminalen Region.

4.2.1 Veränderungen im Bereich der Phosphorylierungsstellen

Die Lage der Austauschstellen ist weit entfernt von den Konsensusstellen für eine Phosphorylierung, so dass ein gestörter Phosphorylierungsprozess eher nicht zu erwarten ist. Der Sequenzvergleich zeigt, dass zwischen den

transmembranösen Einheiten S1 bis S6 die Abfolge der Aminosäuresequenz bei allen Spezies konstant ist und somit eine Funktionsänderung infolge der Änderung der molekularen Komposition unwahrscheinlich erscheint. Insbesondere stellt sich die Porenregion zwischen S5 und S6 des klonierten Kv4.2-Kanals des Schweins im Vergleich mit den homologen Sequenzabschnitten von Ratte und Mensch als identisch dar.

4.2.2 Veränderungen im Bereich der KChIP-Bindungsstellen

In der Literatur ist beschrieben, dass die α -Untereinheiten in ihren Eigenschaften stark durch KChIP moduliert werden [6, 10, 21, 64, 83]. Im Herzgewebe ist KChIP2 die vorherrschende Isoform von KChIP [6, 74]. Für die Expression von Kv4-Kanälen und von KChIP an der Zellmembran und auf mRNA-Ebene werden zwischen Epikard und Endokard ähnliche Gradienten wie für die Dauer des Aktionspotenzials beschrieben [8,71,74]. Momentan werden für die Interaktion des Kv4.2-Kanalproteins mit KChIP2 das N-terminale Ende der Kv4.2-Sequenz [6, 15], der Bereich der Tetramerisierungsdomäne (T 1) [15, 79] und das C-terminale Ende Kv4.2-Sequenz [15, 44] als verantwortlich betrachtet.

Im Bereich des relevanten Abschnittes des N-terminalen Endes der Aminosäuresequenz des Kv4.2 des Schweins finden sich keine Veränderungen im Vergleich zu den entsprechenden Sequenzen von Mensch und Ratte.

Im Bereich der Tetramerisierungsdomäne (T 1) findet sich bei der Schweinsequenz an Position 43 die Aminosäure Alanin, im Gegensatz zu Mensch und Ratte, bei denen an dieser Stelle Valin steht. Da Alanin und Valin sich lediglich durch eine hydrophobe Seitenkette unterscheiden, kann postuliert werden, dass dieser Austausch ohne Auswirkung auf die Interaktion zwischen des Kv4.2-Kanalkomplexes und KChIP2 bleibt.

Im Bereich des C-terminalen Endes befindet sich an Position 438 der Aminosäuresequenz des Kv4.2 des Schweins Glutamat. Bei Mensch und Ratte steht Lysin. Glutamat ist bei einem physiologischem pH-Wert negativ

geladen, während Lysin bei physiologischem pH-Wert positiv geladen ist. Die Auswirkung auf die die Interaktion zwischen des Kv4.2-Kanalkomplexes und KCHIP2 bleibt unklar.

4.3 Funktion des Kv4.2 des Schweineherzens

Die heterologe Expression des Kv4.2 des Schweins in *Xenopus-laevis*-Oozyten hat gezeigt, dass die gemessenen Ströme den Strömen von heterolog exprimierten Kv4.2-Kanälen der Ratte sehr ähnlich waren [6]. Diese elektrophysiologischen Daten weisen auf eine intakte molekulare Funktion des Kv4.2 hin, der im linksventrikulären Gewebe des Schweins exprimiert ist. Diesen Ergebnissen nach zu urteilen scheint die verminderte funktionelle Expression respektive das Fehlen des I_{to1} im linken Ventrikel des Schweins weder auf eine veränderte molekulare Struktur noch auf eine Fehlfunktion der Kv4- α -Untereinheit zurückzuführen zu sein, so dass andere mögliche Effektoren (z. B. β -Untereinheiten etc.) betrachtet werden müssen.

4.4 Expression des Kv4.2-Protein in linksventrikulären Myozyten des Schweins

Eine weitere mögliche Ursache für eine geringe Stromgröße oder gar für das Fehlen des I_{to} [81] in den Herzzellen des Schweins könnte eine nicht ausreichende Expressionsrate des Kv4.2-Proteins im Herzgewebe des Schweins sein. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden von der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Ehmke an Gewebeproben aus dem linken Ventrikel des Schweineherzens immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Die Experimente mittels spezifischer Antikörper ergaben, dass das Kv4.2-Protein im Herzgewebe des Schweins exprimiert ist. Als Vergleich diente Herzgewebe der Ratte, bei dem eine Expression von Kv4.2 gesichert und gleichzeitig ein signifikant großer I_{to} im Unterschied zum Myokard des

Schweins messbar ist. Hinsichtlich der Kv4.2-Proteinexpression wurden keine signifikanten Signalunterschiede zwischen Ratten- und Schweinegewebe gefunden.

4.5 Beeinflussung der Funktion der Kv4-Untereinheiten durch KChIP

In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Ehmke wurde in der Folgezeit des hier vorgestellten Projektes eine KChIP-Nukleotidsequenz, die im linksventrikulären Gewebe des Schweineherzens exprimiert ist und die eine hohe Übereinstimmung mit den Sequenzen vom KChIP2.2 des Menschen und der Ratte [6, 10, 71] hat, kloniert. Elektrophysiologische Messungen nach heterologer Koexpression von Kv4.2 und KChIP2 zeigten eine hohe Übereinstimmung mit den Messergebnissen bei Ratte und Hund [6, 10]. Diese Ergebnisse erklären die starke Reduktion oder das gänzliche Fehlen des I_{to} infolge einer Änderung der molekularen Struktur von KChIP2.2 oder der Funktion von KChIP in Interaktion mit der Kv4- α -Untereinheit nicht.

4.6 Expression von I_{to1} in linksventrikulären Kardiomyozyten beim Schwein

Durch die Klonierung sowie die Determinierung der für den Kanal codierenden Nukleotidsequenz konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine hohe Übereinstimmung zu den Nukleotidsequenzen der Kv4.2-Kanäle von Mensch und Ratte besteht, die als morphologisches Korrelat für den I_{to1} angesehen werden. Die heterologe Expression zeigte, dass es sich bei dem klonierten Kv4-Kanal des Schweins um eine funktionstüchtige α -Untereinheit handelt. Diese Untersuchungen stützen die These (vgl. Lacroix et al. [51]), dass der I_{to1} in Myozyten des Schweineherzens exprimiert ist. Messungen, die in unserer Arbeitsgruppe von Prof. Tilmann Volk an einzelnen Myozyten des

Schweineherzens durchgeführt wurden, zeigen einen 4-Aminopyridin-sensitiven Strom bei dem es sich somit um den I_{to1} handeln könnte. Die Größe dieses Stromes lag durchschnittlich bei nur $< 0,2 \text{ pA pF}^{-1}$ (bei $V_{Pip} = +40 \text{ mV}$). Im Vergleich dazu besitzen Myozyten aus mittleren Myokardabschnitten von Hund und Mensch, die eine dem Schwein ähnliche Ruhfrequenz haben, einen etwa 50-fach größeren I_{to1} bei Zimmertemperatur gemessen [54,63]. Auch der von Lacroix et al. [51] in mittleren Myokardabschnitten und subendokardialen Myozyten des Schweins identifizierte I_{to1} hatte nur eine durchschnittliche Stromgröße von $0,4\text{-}0,5 \text{ pApF}^{-1}$ (bei $V_{Pip} = +50 \text{ mV}$), was dafür spricht, dass die Größe des I_{to1} in Myozyten des Schweins deutlich geringer sein könnte als bei anderen Spezies. Die geringen Unterschiede bezüglich der Stromdichte zwischen den von uns vorgelegten Ergebnissen und denen von Lacroix et al. könnten im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Messtemperaturen stehen [51].

Der I_{to1} als 4-Aminopyridin-sensitiver Strom konnte in den Experimenten von Prof. Volk nur in 17 % der vermessenen Kardiomyozyten des Schweins identifiziert werden. Dabei fiel auf, dass zusätzlich zwischen Myozyten aus mittleren Myokardabschnitten und Zellen aus der subendokardialen Region noch einmal ein Unterschied hinsichtlich der Expression des I_{to1} besteht. Der Anteil von Kardiomyozyten, die einen kleinen I_{to1} haben, lag bei den Zellen aus mittleren Myokardabschnitten bei etwa 12 %, bei den Zellen aus der subendokardialen Region bei etwa 30 %. Das Fehlen eines nachweisbaren I_{to1} in der deutlich überwiegenden Mehrheit der untersuchten isolierten Kardiomyozyten aus linksventrikulärem Schweinemyokard (durchschnittlich 83 %) könnte durchaus eine gute Erklärung darstellen, wie Li et al. [55] zu ihrem Ergebnis kamen, dass I_{to1} im Schweinemyokard nicht exprimiert sei.

4.7 Ausblick

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass im linken Ventrikel des Schweineherzens Kv4.2 mit sehr ähnlichen funktionellen Eigenschaften wie Kv4.2 und/oder Kv4.3 im linksventrikulären Gewebe der Ratte, des Kaninchens und des Menschen exprimiert wird. Darüber hinaus geben die Daten Hinweise darauf, dass sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene die Expression im linken Ventrikel von Schwein und Ratte ähnlich ist [8]. Entsprechend diesen Ergebnissen kann der außergewöhnlich kleine I_{to1} im linken Ventrikel des Schweineherzens, der auch in vorhergehenden Untersuchungen [51, 55] beobachtet wurde, nicht durch eine Änderung der molekularen Funktion, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, oder durch eine quantitativ geringere Expression der Kv4.2-Kanal-Proteine erklärt werden. Hinsichtlich einer Erklärung bleibt zu vermuten, dass der I_{to1} in vivo entweder durch die KChIP2-Untereinheiten differierend zum heterologen Expressionsmodell moduliert wird oder noch weitere bisher unbekannte molekulare Komponenten existieren, die die Amplitude des durch Kv4.2 modulierten Stromes beim Schwein beeinflussen.

Welche alternativen Einflussfaktoren es gibt, die eine Änderung des I_{to1} bewirken könnten, müsste in weiteren Experimenten untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Der kardiale transiente Kalium-Auswärtsstrom (I_{to1}) spielt bei großen Säugetieren, einschließlich des Menschen, eine führende Rolle bei der frühen Repolarisation. Der I_{to1} zeigt innerhalb der linksventrikulären Herzwand einen regelhaften Gradienten von Epikard zu Endokard. Neuere Studien haben gezeigt, dass die Größe des Ca^{2+} -unabhängigen transienten Auswärtsstroms (I_{to1}) im linken Ventrikel des Schweineherzens sehr klein ist. Deshalb wurde untersucht, ob eine veränderte molekulare Expression oder Funktion der spannungsabhängigen Kaliumkanäle, die zur Kv4-Untergruppe gehören und bei anderen Spezies für den Hauptteil des I_{to1} verantwortlich sind, die Ursache für das Fehlen eines signifikanten I_{to1} im Schweineherzen sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels RT-PCR-Analyse mit degenerierten Primern gezeigt werden, dass Kv4.2-mRNA sowohl im Gewebe des linken Ventrikels des Schweineherzens als auch in isolierten Myozyten des Ventrikel vorhanden ist. Die Klonierung eines Mitgliedes der Kv4-Kaliumkanalfamilie mittels PCR ergab eine Übereinstimmung von mehr als 96 % mit den Mitgliedern des Kv4.2 der Ratte und des Menschen auf der Ebene der Aminosäuresequenz. Messungen am heterologen Expressionssystem (*Xenopus-laevis*-Oozyten) zeigen, dass der durch den Kv4.2-Kanal des Schweins generierte Strom ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften besitzt wie der I_{to1} bei der Ratte und dem Menschen. Messungen aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Ehmke, die infolge der vorgelegten Arbeit durchgeführt wurden, weisen darauf hin, dass sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene die Expressionsraten von Kv4.2 im linken Ventrikel des Schweins und der Ratte ähnlich sind. Entsprechend diesen Ergebnissen kann der außergewöhnlich kleine I_{to1} im linken Ventrikel des Schweineherzens weder durch eine Änderung der molekularen Funktion, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, noch durch eine quantitativ geringere Expression der Kv4.2-Kanal-Proteine erklärt werden. Weitere Untersuchungen zu möglichen Ursachen der fehlenden funktionellen Expression des I_{to1} müssen folgen.

6. Abkürzungsverzeichnis

6.1 Verwendete Abkürzungen von Maßeinheiten

bp	Basenpaare
fg	Femtogramm
G	Erdbeschleunigung
mg	Milligramm
min	Minuten
µg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
U	Enzymeinheit (units)
Upm	Umdrehungen pro Minute

6.2 Verwendete Buchstabenkodierung der Aminosäuren

A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutaminsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin

P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin

6.3 Weitere Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Aktionspotenzialdauer
Amp	Ampicillin
AP	Aminopyridine
AT	Annealing-Temperatur
AUAP	Abridged Universal Amplification Primer
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	komplementäre DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
GSP	genspezifischen Primer
I_{to1}	transienter Kaliumauswärtsstrom (to = „transient outward“)
IPTG	Isopropylthio Galaktosid
Kchip	Kv channel interacting protein
LB	Luria-Betani
MBL	Modified Bath Solution
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

pg	Picogramm
RACE-PCR	Rapid amplifikation of cDNA ends
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
TBE	Tris-Borat-EDTA
TdT	Terminal deoxyNukleotidyl Transferase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ammoniummethan
UAP	Universal Amplification Primer
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-D- Galaktopyranosid

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Agarosekonzentration und optimal darstellbare DNA-Fragmentlängen[Quelle: Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York] [77].....	18
Abbildung 2:	1 kb-DNA-Ladder zur Bestimmung der Fragmentlänge [Quelle: Promega].....	20
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des pGEM-T Vektors mit Auflistung der Restriktionsenzymschnittstellen, Größe: 3000 bp, Amp ^r : Ampicillinresistenzgen, lacZ:-Gen des α -Peptid der β -Galaktosidase [Quelle: Invitrogen].....	23
Abbildung 4:	pGemT Enzymschnittstellen [Quelle: Promega]	29
Abbildung 5:	Übersicht über das 3'-RACE-Verfahren [Quelle: Invitrogen]..	34
Abbildung 6:	Überblick über das 5'-RACE-Verfahren [Quelle: Invitrogen]..	39
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der Messanordnung für Two-Electrode Voltage-Clamp	50

Abbildung 8: PCR-Produkt nach der Amplifikation mit degenerierten Primern, M = Marker, Kv = Fragment aus Schweinemyokard, Kv4.2 =Southern Blotting mittels Kv4.2 Sonde	51
Abbildung 9: Amplifikation des Full length Klonen.....	55
Abbildung 10: Transienter Auswärtsstrom der heterolog in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten exprimierten Kv4- α -Untereinheit des Schweins.	70

8. Literaturverzeichnis

1. Alberts B, Bray D, Lewis J; Raff M, Roberts K and Watson JD (1989) *Molecular Biology of the Cell*. 2nd ed., Garland Publishing New York, London
2. Alvarez-Leefmans FJ (1992) Extracellular Reference Electrodes. 172-182 in: Gatyn, R., Kettenmann, H. (eds.): *Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology*. 1st ed., New York
3. Amos GJ, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel HM, Ravens U (1996) Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol* 491:31-50
4. Apkon M and Nerbonne JM. (1991) Characterization of two distinct depolarization-activated K⁺ currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 97:973-1011
5. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds) (1987) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York
6. An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling H-P, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ (2000) Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 403:553-556
7. Baldwin TJ, Tsaour ML, Lopez GA, Jan YN, Jan LY (1991) Characterization of a mammalian cDNA for an inactivating voltage-sensitive K⁺ channel. *Neuron* 7:471-83
8. Barry Dm, Trimmer JS, Merlie JP et al. (1995) Differential expression of voltage-gated K⁺ channel subunits in adult rat heart. Relation to functional K⁺ channels? *Circ res* 77:361-369.
9. Barry DM, Xu H, Schuessler RB, Nerbonne JM (1998) Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4 alpha subunit. *Circ Res* 83:560-567

10. Bähring R, Dannenberg J, Peters HC, Leichert T, Pongs O, Isbrandt D (2001) Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *J Biol Chem* 276:23888-23894
11. Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E (1993) Alterations of K^+ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 73:379-385
12. Birnboim HC, Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* Nov 24;7(6):1513-23
13. Blair TA, Roberds SL, Tamkun MM, Hartshorne RP, (1991) Functional characterization of RK5, a voltage-gated K^+ channel cloned from the rat cardiovascular system. *FEBS Lett.*;295(1-3):211-3
14. Brahmajothi MV, Campbell DL, Rasmusson RL, Morales MJ, Nerbonne JM, Strauss HC (1999) Distinct transient outward potassium current (I_{to}) phenotypes and distribution of fast-inactivating potassium channel alpha subunits in ferret left ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 113:581-600
15. Callsen B, Isbrandt D, Sauter K, Hartmann LS, Pongs O, Bähring R (2005) Contribution of N- and C-terminal Kv4.2 channel domains to KChIP interaction. *J Physiol* 568 (Pt 2), S. 397–412
16. Campbell DL, Rasmusson RL, Qu Y, Strauss HC (1993) The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. I. Basic characterization and kinetic analysis. *J Gen Physiol* 101:571-601
17. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*: 162(1):156-9
18. Clark RB, Bouchard RA, Salinas-Stefanon E, Sanchez-Chapula J, Giles WR (1993) Heterogeneity of action Potential waveforms and potassium currents in rat ventricle. *Cardiovasc Res* 27:1795-1799
19. Coraboeuf E, Carmeliet E (1982) Existence of two transient outward current in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflugers Arch* 392:352-359
20. Coraboeuf E, Coulombe A, Deroubaix E, HAtem S, Mercadier JJ (1998) Transient outward potassium current and repolarization of cardiac cells. *Bull Acad Natl Med* 182:325-333
21. Decher N, Uyguner O, Scherer CR, Karaman B, Yüksel-Apak M, Busch AE, Steinmeyer K, Wollnik B (2001) hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: Cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant. *Cardiovasc Res* 52:255-264
22. Dietzel I; Bruns D; Polder HR; Lux HD (1992) Voltage clamp recording, 256-262 in: *Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology*. 1st ed. In New York
23. Dilks D, Ling HP, Cockett M, Sokol P, Numann R (1999) Cloning and expression of the human kv4.3 potassium channel. *J Neurophys* 81(4):1974-7
24. Dixon JE, McKinnon D (1994) Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. *Circ Res* 75:252-260

25. Dixon JE, Shi W, Wang HS, Mc Donald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D (1996) Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* 79:659-668 Erratum in: *Circ Res* 80(1):147
26. Dumont J. N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136, 153-179
27. Fiset C, Clark RB, Shimoni Y, Giles WR (1997) Shal-type channels contribute to the Ca²⁺-independent transient outward K⁺ current in rat ventricle. *J Physiol* 500:51-64
28. Frohman MA, Dush MK, Martin GR (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 85,8998
29. Greenstein JL, Wu R, Po S, Tomaselli GF, Winslow RL (2000) Role of the calcium-independent transient outward current I_{to1} in shaping action Potenzial morphology and duration. *Circ Res* 87:1026-1033
30. Guo W, Li H, London B, Nerbonne JM (2000) Functional consequences of elimination of I_{to, f} and I_{to, s}: early afterdepolarizations, atrioventricular block, and ventricular arrhythmias in mice lacking Kv1.4 and expressing a dominant-negative Kv4 α subunit. *Circ Res* 87:73-79
31. Guo W, Li H, Aimond F, Johns DC, Rhodes KJ, Trimmer JS, Nerbonne JM (2002) Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K⁺ currents. *Circ Res* 90:586-593
32. Guo W, Xu H, London B and Nerbonne JM (1999) Molecular basis of transient outward K⁺ current diversity in mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 521, 587–599
33. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers. Arch.* 391 S. 85 – 100
34. Hanahan D (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. DNA cloning – A practical approach. IRL Press, Oxford 1, 109-135
35. Hecker R (1989) Die Struktur der intermediären Ribonukleinsäuren bei der Replikation von Viroiden. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
36. Hille B (1992) Ionic Channels of Excitable Membranes. 2nd ed. Sunderland Massachusetts
37. Hiraoka M, Kawano S (1989) Calcium-sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 410:187-212
38. Hiraoka M, Kawano D, Hirano Y, Furukawa T (1998) Role of cardiac chloride currents in changes in action Potenzialcharacteristica and arrhythmias. *Cardiovasc Res* 40:23-33
39. Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, Johnston D (1997) K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387:869-875
40. Hoppe UC, Marban E and Johns DC (2000) Molecular dissection of cardiac repolarization by in vivo Kv4.3 gene transfer. *J. Clin. Invest.* 105, 1077–1084

41. Isbrandt D, Leicher T, Waldschutz R, Zhu X, Luhmann U, Michel U, Sauter K and Pongs O (2000) Gene structures and expression profiles of three human KCND (Kv4) potassium channels mediating A-type currents I(to) and I(sa). *Genomics* 64:144-154
42. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) (1990) PCR protocols. Academic Press, San Diego
43. Jeck C, Pinto J, Boyden P (1995) Transient outward currents in subendocardial Purkinje myocytes surviving in the infarcted heart. *Circulation* 92:465-473
44. Jerng HH, Covarrubias M (1997) K⁺ channel inactivation mediated by the concerted action of the cytoplasmic N- and C-terminal domains. *Biophys J* 72, 163-174
45. Johns DC, Nuss HB and Marban E. (1997) Suppression of neuronal and cardiac transient outward currents by viral gene transfer of dominant-negative Kv4.2 constructs. *J Biol Chem* 272:31598-31603
46. Kääh S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA, Marbán E, Tomaselli GF (1996) Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 78:262-273
47. Kääh S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF (1998) Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 98:1383-1393
48. Kenyon JL, Gibbons WR (1979) 4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 73:139-157
49. Kong W, Po S, Yamagishi T, Ashen MD, Stetten G, Tomaselli GF, (1998) Isolation and characterization of the human gene encoding Ito: further diversity by alternative mRNA splicing. *Am J Physiol* 275(6 Pt 2):H1963-70
50. Kuo H-C, Cheng C-F, Clark RB, Lin JJ-C, Lin JL-C, Hoshijima M, Nguyen-Tran VT-B, Gu Y, Ikeda Y, Chu P-H, Ross J, Giles WR, Chien KR (2001) A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of Ito and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 107:801-813
51. Lacroix D, Gluais P, Marquie C, D Hoinne C, Bastide M. (2002) Repolarization abnormalities and their arrhythmogenic consequences in porcine tachycardia-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.*;54:42-50
52. Lambrigts D, Sachs DH, Cooper DK (1989) Discordant organ xenotransplantation in primates: world experience and current status. *Transplantation* 66(5):547-61
53. Lee CC, Caskey CT (1990) Rapid amplification of cDNA ends. M. A. Innis, and D. H. Gelfand, and J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications* 46.-53. Academic Press, New York

54. Litovsky SH, Antzelevitch C (1988) Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res* 62:116-126
55. Li GR, Du XL, Siow YL, O K, Tse HF, Lau CP (2003) Calcium-activated transient outward chloride current and phase 1 repolarization of swine ventricular action Potenzial. *Cardiovasc Res.* 58:89-98
56. Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M. (1998) Transmural heterogeneity of action Potenzials and Ito1 in myocytes isolated from the human right ventricle. *Am J Physiol.* ;275(2 Pt 2):H369-77
57. MacKinnon R (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350:232-235
58. Marty A, Neher E (1995) Tight-seal whole-cell recording. in In Sakmann B and Neher E (Eds.), *Single-Channel Recordings*, Plenum Press, New York and London, pp. 31-51.
59. Monyer H, Jonas P (1995) Polymerase chain reaction analysis of ion channel expression in single neurons of brain slices. In: Sakman B, Neher E (eds) (1995) *Single-channel recording*. 2nd edn. Plenum Press, New York, 1995:357-373
60. Müller CM (1992) Intracellular Microelectrodes 183-188 in: Gatyn, R., Kettenmann, H. (eds.): *Practical Electrophysiological Methods: guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology*. 1st ed. In New York
61. Nadal MS, Amarillo Y, de Miera EV, Rudy B (2001) Evidence for the presence of a novel Kv4-mediated A-type K⁺ channel-modifying factor. *J Physiol* 537:801-809
62. Näbauer M, Beuckelmann DJ, Erdmann E (1993) Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patient with terminal heart failure. *Circ Res* 73:386-394
63. Näbauer M, Beuckelmann DJ, Überfuhr P, Steinbeck G (1996) Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of the human left ventricular. *Circulation* 93:168-177
64. Nerbonne JM (2000) Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 525:285-298
65. Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL an Escande D (2001) Genetic manipulation of cardiac K⁺ channel function in mice: what we have learned, and where do we go from here? *Circ Res* 89 944-956
66. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* Apr 11;17(7):2503-16
67. Ohlemeyer C; Meyer JW (1992) The Faraday Cage and Grounding Arrangements. 3-5 in: Gatyn, R., Kettenmann, H. (eds.): *Practical Electrophysiological Methods: Practical Electrophysiological Methods*: 1st ed. ; New York
68. Ohya S, Tanaka M, Oku T, Asai Y, Watanabe M, Giles WR, Imaizumi Y, (1997) Molecular cloning and tissue distribution of an alternatively spliced variant of an A-type K⁺ channel alpha-subunit, Kv4.3 in the rat. *FEBS Lett.* 20(1):47-53

-
69. Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Backx PH (2001) The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I_{to}) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* ;33(5):851-72. Review
 70. Pak MD, Baker K, Covarrubias M, Bultler A, Ratcliffe A, Salkoff L (1991) $mShal$, a subfamily of A-type K^+ channel cloned from mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4386-90
 71. Patel SP, Campbell DL, Morales MJ, Strauss HC (2002) Heterogeneous expression of KChIP2 isoforms in the ferret heart. *J Physiol* 539:649-656
 72. Roberds SL and Tamkun MM (1991) Cloning and tissue-specific expression of five voltage gated potassium channel cDNAs expressed in rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1798-1802
 73. Rodriguez-Sinovas A, Cinca J, Tapias A, Armandas L, Tresanchez M, Soler-Soler J (1997) Lack of evidence of M-cells in Porcine left ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 33:307-13
 74. Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang H-S, Cohen I, Dixon JE, McKinnon D (2001) Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* 533:119-125
 75. Rudy B; Iverson LE (1992) Ion Channels, 325-333 in Abelson, JN; Simon MI: *Methods in Enzymology* 207; 325-333 Academic Press, INC.
 76. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) *Science* 230,1350
 77. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York
 78. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
 79. Scannevin RH, Wang K, Jow F, Megules J, Kopsco DC, Edris W, Carroll KC, Lu Q, Xu W, Xu Z, Katz AH, Olland S, Lin L, Taylor M, Stahl M, Malakian K, Somers W, Mosyak L, Bowlby MR, Chanda P & Rhodes KJ (2004) Two N-terminal domains of Kv4 K^+ channels regulate binding to and modulation by KChIP1. *Neuron* 41, 587-598
 80. Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S (2002) Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 90:939-50
 81. Serodio P, Kentros C, Rudy B (1994) Identification of molecular components of A-type channels activating at subthreshold Potentials. *J Neurophys* 72:1516-1529
 82. Serodio P, Rudy B (1998) Differential expression of Kv4 K^+ channel subunits mediating subthreshold transient K^+ (A-type) currents in rat brain. *J Neurophys* 79(2):1081-91
 83. Shibata R, Misonou H, Campomanes CR, Anderson AE, Schrader LA, Doliveira LC, Carroll KI, Sweatt JD, Rhodes KJ, Trimmer JS (2003) A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *J Biol Chem.* 278(38):36445-54

84. Shipsey SJ, Bryant SM, Hart G (1997) Effects of hypertrophy on regional action Potenzial characteristics in the rat left ventricle: a cellular basis for T-wave inversion? *Circulation* 96:2061-2068
85. Singer M and Berg P (1991) *Genes and genomes: A changing perspective*. Ca, Mill Valley University Books
86. Sipido KR, Callewaert G, Carmeliet E (1993) $[Ca^{2+}]_i$ transients and $[Ca^{2+}]_i$ -dependent chloride current in single Purkinje cells from rabbit heart. *J Physiol* 468:641-667
87. Smith TG, Lecar J, Redmann SJ, Gage PW (1985) *Voltage and Patch Clamping with Mikroelektrodes* American Physiological Society, Bethesda, Maryland, (Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland)
88. Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis *Biotechnology*. 1992;24:122-39
89. Standen NB, Green P, Whitaker MJ (1987) „Mikroelektrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook.“
90. Stankovicova T, Szilard M, De Scheerder I, Sipido KR. (2000) M cells and transmural heterogeneity of action Potenzial configuration in myocytes from the left ventricular wall of the pig heart. *Cardiovasc Res*. 454:952-60
91. Tomita F, Bassett AL, Myerburg RJ, Kimura S (1994) Diminished transient outward currents in rat hypertrophied ventricular myocytes. *Circ Res* 75:296-303
92. Tsaor ML, Chou CC, Shih YH, Wang HL (1997) Cloning, expression and CNS distribution of Kv4.3, an A-type K^+ channel alpha subunit. *FEBS Lett* 400(2):215-20
93. Tseng GN, Hoffman BF (1989) Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes. *Circ Res*. 64(4):633-47
94. van der Giessen WJ, Mooi W, Rutteman AM, van Vliet HH, Slager CJ, Verdouw PD (1983) A new model for coronary thrombosis in the pig: preliminary results with thrombolysis. *Eur Heart J. Suppl C*:69-76
95. Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM (1997) Outward K^+ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 80:772-781
96. Verdouw PD, Wolffenbuttel BH, (1983) The effect of felodipine on ventricular fibrillation after coronary artery ligation in the anaesthetized pig *Br J Pharmacol*. 79(1):6-8
97. Verdouw PD, Wolffenbuttel BH, van der Giessen WJ (1983) Domestic pigs in the study of myocardial ischemia. *Eur Heart J. Suppl C*:61-7
98. Volk T, Nguyen TH-D, Schultz J-H, Ehmke H (1999) Relationship between transient outward K^+ current and Ca^{2+} influx in rat cardiac myocytes of endo- and epicardial origin. *J Physiol* 519:841-850
99. Volk T, Nguyen TH-D, Schultz J-H, Faulhaber J, Ehmke H (2001) Regional alterations of repolarizing K^+ currents among the left ventricular free wall of rats with ascending aortic stenosis. *J Physiol* 530:443-455

-
100. Wettwer E, Amos G, Gath J, Zerkowski HR, Reidemeister JC, Ravens U (1993) Transient outward current in human and rat ventricular myocytes.
 101. Wettwer E, Amos G, Posival H, Ravens U (1994) Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res* 75:473-482
 102. Xu H, Guo W, Nerbonne JM. (1999) Four kinetically distinct depolarisation-activated K^+ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol*. 113:661-678
 103. Yeola SW, Snyders DJ (1997) Electrophysiological and pharmacological correspondence between Kv4.2 current and cardiac transient outward current. *Cardiovasc Res* 33:540-547
 104. Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z, Nattel S (1997) Ionic remodeling underlying action Potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res* 81:512-525
 105. Zhu XR, Wulf A, Schwarz M, Isbrandt D, Pongs O (1999) Characterization of human Kv4.2 mediating a rapidly-inactivating transient voltage-sensitive K^+ current. *Receptors Channels* 6(5):387-400
 106. Zygmunt AC, Gibbons WR (1991) Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 68:424-437
 107. Zygmunt AC (1994) Intracellular calcium activates a chloride current in canine ventricular myocytes. *Am J Physiol* 267:H1984-H1995
 108. Zygmunt AC, Robitelle DC, Eddlestone GT (1997) Ito1 dictates behavior of $I_{Cl(Ca)}$ during early repolarisation of canine ventricle. *Am J Physiol* 273:H1096-H1106

9. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H. Ehmke für die Überlassung des Themas, die freundschaftliche, kompetente und engagierte Zusammenarbeit und besonders für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Bei Herrn Prof. Dr. H. Seller bedanke ich mich für die Überlassung von Laborräumen und die Bereitstellung der notwendigen Reagenzien sowie entscheidende Impulse für meine medizinische Ausbildung.

Herrn Prof. Dr. med. Tilmann Volk und Herrn Dipl. Ing. Peter Bassalay danke ich für die Durchführung der elektrophysiologischen Experimente. Herrn Rudolph Dussel danke ich für die Unterstützung im Erlernen der molekularbiologischen Techniken. Frau Telse Kock danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche in Hamburg.

Herrn Dr. med. J. Faulhaber danke ich für die Beratung in formalen und organisatorischen Fragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn P.D. Dr. med. J.-H. Schultz.

Abschließend danke ich meinen Eltern, Margarete und Siegfried Schoensee, danke ich für ihr Engagement bezüglich meiner Ausbildung. Ohne ihre Unterstützung wäre mein Studium sicherlich nicht möglich gewesen, ihnen sei diese Arbeit gewidmet.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Bernhard Michael Schoensee
Geburtsdatum: 26. Oktober 1972
Geburtsort: Heilbronn / Neckar
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift: Holländische Reihe 31
22765 Hamburg

Beruflicher Werdegang

06/2006- dato Assistenzarzt in der Urologischen Klinik der Asklepios Klinik Altona (Hamburg)
05/2005-05/2006 Assistenzarzt in der III. Medizinischen Klinik des Allgemeinen Krankenhauses Altona (Hamburg)
10/2004-04/2005 Assistenzarzt in der II. Medizinischen Klinik des AK St. Georg (Hamburg)
07/2004-09/2004 Arzt im Praktikum in der II. Medizinischen Klinik des AK St. Georg (Hamburg)

Universitärer Werdegang

III. Klinischer Abschnitt:

06/2004 III. Staatsexamen
12/2003-03/2004 Innere Medizin
Allgemeines Krankenhaus Altona, Hamburg
III. Medizinische Klinik (Kardiologie und Pneumologie)

(Leitender Arzt: Prof. Dr. Dipl.-Ing. Klaus von Olshausen)

08/2003-12/2003 Chirurgie
 Marienkrankenhaus, Hamburg
 (Chefarzt I. Chirurgische Klinik: Prof. Dr. med. Christian Müller; Chefarzt II. Chirurgische Klinik: Dr. med. U. Lütjohann)

04/2003-08/2003 Dermatologie und Venerologie (Wahlfach)
 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
 (Direktorin: Prof. Dr. I. Moll)

II. Klinischer Abschnitt:

03/2003 II. Staatsexamen
 10/2000-03/2003 Medizinische Fakultät der Universität Hamburg

I. Klinischer Abschnitt:

08/2001 I. Staatsexamen
 03/2000-08/2001 Medizinische Fakultät der Universität Hamburg
 10/1999-03/2000 Fakultät für klinische Medizin Mannheim

Vorklinischer Abschnitt:

09/1999 Physikum
 04/1994-08/1999 Medizinische Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Zivildienst

10/1992-12/1993 Arbeiter-Samariter-Bund, Heilbronn

Schulischer Werdegang

05/1992 Allgemeine Hochschulreife
 09/1983-06/1992 Justinus-Kerner-Gymnasium, Heilbronn
 09/1979-06/1983 Grundschule, Heilbronn

Famulaturen

- 08/2002 Urologie, Praxis Dr. med. N. Fellenberg, Hamburg
- 02/2002 Neurologische Klinik, Marienkrankenhaus,
Hamburg
(Chefarzt: Prof. Dr. med. Th. Weber)
- 09/2001 I. Chirurgische Klinik, Marienkrankenhaus,
Hamburg
(Chefarzt: Prof. Dr. med. B. Buchholz)
- 03/2001 Institut für Radiologie, Marienkrankenhaus,
Hamburg
(Chefarzt: Dr. med. H. Denkhaus)
- 02/2001 II. Medizinische Klinik, Marienkrankenhaus,
Hamburg
(Chefarzt: Dr. med. G. Habel)

11. Eidesstattliche Versicherung

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 zur Promotion beworben habe

Unterschrift:

Bernhard Schoensee, im Januar 2008