Virale Expression der Kv1.4 und Kv4.2 α-Untereinheiten spannungsaktivierter Kaliumkanäle in primär kultivierten Neuronen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

-Dr. rer. Nat.-

des Fachbereiches Chemie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Matthias Dietz

aus Hamburg

Hamburg 1999

1. Gutachter Prof. Dr. Marquardt

2. Gutachter Prof. Dr. Pongs

Letzte mündliche Prüfung am 26. April 1999

Ich danke Herrn Professor Dr. Olaf Pongs für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Arbeit unter den hervorragenden Bedingungen des Instituts für Neurale Signalverarbeitung am Zentrum für Molekulare Neurobiologie durchführen zu können.

Mein Dank gilt Frau PhD Catherine Stansfield und Saskia Siegel für die Einführung in die Präparation und Kultivierung von Neuronen sowie der Diplom Biologin Andrea Wulf für die Zusammenarbeit bei den elektrophysiologischen Untersuchungen.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Neurale Signalverarbeitung danke ich für ihre Anregungen und Fragen, Hilfestellungen und Antworten, Kommentare und Vorschläge.

Nicht zuletzt gebührt mein Dank Professor Dr. Hans Marquardt von der Abteilung für Allgemeine Toxikologie des Pharmakologischen Institutes der Universität Hamburg, der diese Arbeit als externe Promotion des Fachbereiches Chemie begutachtet hat.

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemachte habe.

Ferner versichere, daß ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Hamburg, den 24. Januar 1999

Inhaltsverzeichnis

V Abkürzungen 1

1. Einleitung 3

1.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle 3

1.2. Proteintransport der Kv-α1.4-Untereinheit im Modellsystem 6

1.3. Ziel der Arbeit 7

2. Material 8

2.1. Lösungen und Bakterienmedien 8

2.2. Zellkulturlösungen und Medie 13

2.3. Oligonukleotide 15

2.4. *E. coli* Bakterienstamm 17

2.5. Bezugsquellen verwendeter Materialien 17

2.6. Sicherheit und Entsorgung 17

3. Methoden 18

3.1. Molekularbiologische Methoden 18

3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion 18

3.1.2. Restriktionsverdau von DNA 19

3.1.3. Mikrodialyse von DNA 19

3.1.4. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten 19

3.1.5. Phosphorylierung von DNA-Fragmenten 20

3.1.6. Auffüllen überhängender 5'-Enden 20

3.1.7. Gelelektrophorese von DNA 20

3.1.8. Isolierung von DNA aus Agarosegelen 21

3.1.9. Ligation von DNA-Fragmenten 21

3.1.10. Transformation von Bakterien 22

3.1.11. Herstellung kompetenter Bakterien 22

3.1.12. PCR aus Einzelkolonien 22

3.1.13. Plasmid-Isolierung 23

3.1.13.1. Plasmid-Isolierung aus Kulturen minimalen Volumens 23

3.1.13.2. Plasmid-Isolierung aus 70 ml-Kulturen 23

3.1.14. Photometrische Quantifizierung von DNA 24

3.1.15. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten zur Hybridisierung 24

3.1.16. Southern-Blot-Analyse nach Gelelektrophorese 25

3.1.17. DNA-Sequenzierung 26

3.1.17.1.	Manuelle DNA-Sequenzierung	26
3.1.17.2.	Automatische DNA-Sequenzierung	27
3.1.18.	Gerichtete in vitro Mutagenese von DNA durch PCR	27
3.1.19.	Herstellung der verwendeten rekombinanten Klone	28
3.1.20.	RNA-Techniken	30
3.1.20.1	RNA-Synthese durch Transkription	30
3.1.20.2.	Gelelektrophorese von RNA	31
3.2.	**Proteinchemische Methoden**	**31**
3.2.1.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
3.2.2.	Western-Blot-Analyse	32
3.2.2.1.	Elektrophoretischer Transfer	32
3.2.2.2.	Membranfärbetechniken	32
3.2.2.3.	Immunoprinting und ECL-Detektion	32
3.3.	**Zellkultur**	**33**
3.3.1.	Gewebekultur	33
3.3.1.1.	Umsetzen der Zellen	34
3.3.2.	Neuronenkultur	34
3.3.2.1.	Reinigung der Deckgläser	34
3.3.2.2.	Beschichtung der Deckgläser	34
3.3.3.	Präparation primärer hippocmapaler Neurone	35
3.3.4.	Präparation primärer Neuronen des peripheren Nervensystems	36
3.3.5.	Kultivierung der primären Neuronenkulturen	37
3.3.6.	Vitalitätstest an primärkultivierten Neuronen	37
3.4.	**Proteinexpression**	**38**
3.4.1.	Transfektion von Expressionsvektoren	38
3.4.1.1.	Kalziumphosohat-Methode	38
3.4.1.2.	Transfektion mit kationischen Lipid-Reagentien	39
3.4.2.	Mikroinjektion von Expressionsvektoren und cRNA	40
3.4.3.	Infektion mit Semliki Forest Virus	41
3.4.3.1.	Herstellung inaktiver rekombinater Viren	41
3.4.3.2.	Aktivierung der rekombinanten Viren	42
3.4.3.3.	Infektion	42
3.4.3.4.	Bestimmung des Virustiters	42
3.5.	**Immunhistochemie**	**43**
3.5.1.	Fixierung der Zellen	43
3.5.2.	Antikörperinkubationen	43
3.6.	**Fluoreszenzmikroskopie**	**44**
3.6.1.	Konfokale Rasterlasermikroskopie	44
3.7.	**Elektrophysiologie**	**45**

3.8.	**Computerunterstützte Sequenzanalyse**	**46**
4.	**Ergebnisse**	**47**
4.1.	**Klonierung der Kv-α4.2-Untereinheit**	**47**
4.2.	**Markierung der Kv-Kanäle mit EGFP**	**50**
4.3.	**Funktionalität der Konstrukte Kv1.4/EGFP und Kv4.2/EGFP**	**54**
4.3.1.	Herterologe Genexpression in Gewebekulturzellen	54
4.3.2.	Elektrophysiologische Charakterisierung von Kv1.4/EGFP und Kv4.2/EGFP	58
4.4.	**Konstruktion von Chimären aus CD4-Rezeptor und Kv α-Untereinheiten**	**61**
4.5.	**Interaktion der CD4-Chimären mit PSD-95**	**64**
4.6.	**Palmitylierung einer Kv β-Untereinheit**	**67**
4.7.	**Heterologe Genexpression im Neuron**	**69**
4.7.1.	Chemische Transfektion von primärkultivierten hippocampalen Neuronen	69
4.7.2.	Mikroinjektion in primärkultivierte Neuronen der Oberren Zervikalganglien	69
4.7.3.	Virale Proteinexpression im Neuron	70
4.7.3.1.	Semliki Forest Virus Expressionssystem	71
4.7.3.2.	Anwendung und Optimierung des SFV-Expressionssystems	71
4.8.	**Zellpolarität der primärkultivierten hippocampalen Neuronen**	**75**
4.9.	**Lokalisation der viral exprimierten Proteine zusammen mit zellspezifischen Proteinen**	**79**
5.	**Diskussion**	**83**
5.1.	**Neuronales Expressionssystem**	**84**
5.2.	**Kv-Konstrukte für den direkten Proteinnachweis**	**86**
5.3.	**Kv-Konstrukte für den indirekten Proteinnachweis**	**88**
5.4.	**Gerichteter Proteintransport nach viraler Expression**	**88**
5.5.	**Palmitylierung der Kv1.1 β-Untereinheit**	**92**
5.6.	**Ausblick**	**93**
6.	**Zusammenfassung**	**95**
6.1.	**Summary**	**97**
7.	**Literaturverzeichnis**	**99**
8.	**Anhang**	**108**
8.1.	**Klonkarten**	**108**
8.2.	**Veröffentlichungen und Kongreßbeiträge**	**113**
8.3	**Lebenslauf**	**114**

V. Abkürzungen (soweit sie im Text nicht näher erklärt wurden)

A	Ampere
Acc.	Accessionnummer
Amp	Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5‘-triphosphat
BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaare
Ci	Curie
cDNA	„coding“ DNA
cRNA	„coding“ RNA
CTP	Cytidin-5‘-triphosphat
d	Durchmesser
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2‘-Desoxyribonukleotid-5‘-triphosphat
ddNTP	2‘, 3‘-Didesoxyribonukleotid-5‘-triphosphat
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium Methylsulfat
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
E. coli	*Escherichia coli*
Fa.	Firma
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fl.	flüssig
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GTP	Guanosin-5‘-triphosphat
h	Hekto- ($x10^2$) Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N‘-2-Ethansulfonsäure
Hz	Hertz
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Mega ($x10^6$), Molar

m	Milli- ($x10^{-3}$), Meter
mIgG	Maus-Immunglobulin G
µ	Mikro- ($x10^{-6}$)
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	„messenger“ (Boten-) RNA
(m^7G(5')ppp(5')G)	
n	Nano- ($x10^{-9}$)
nt	Nukleotid
OAc	Acetat
OD	Optische Dichte
Ω	Ohm
p	Pico- ($x10^{-12}$)
Pa	Pascal
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PVDF	Polyvinyldifluorid
Pipes	Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure]
RNA	Ribonukleinsäure
rIgG	Kaninchen-Immunglobulin G
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Tymidin-5‘-triphosphat
U	Einheit
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5‘-triphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

Die Nervenzelle (Neuron) stellt die kleinste konstituierende Einheit des Nervensystems dar. Durch spezifische interzelluläre Kontaktstellen, den Synapsen, sind die Neuronen untereinander verschaltet. Diese Verschaltung ermöglicht die neuronale Kommunikation zwischen den Neuronen in Form von elektrischen und chemischen Signalen. Dabei wird eine gerichtete Informationsübertragung durch die polarisierte Struktur eines Neurons gewähleistet. Diese resultiert aus den vier morphologisch definierten Bereichen eines Neurons, dem Zellkörper (Soma), den zur Informationsaufnahme befähigten Dendriten (postsynaptisch), dem zur Signalweiterleitung befähigten Axon und den zur Signalübertragung spezialisierten präsynaptischen Endungen.
Auf molekularer Ebene werden elektrische Signale über den Fluß von Ionen durch die Plasmamembran initiiert oder prozessiert. Spezielle Membranproteine, die Ionenkanäle, vermitteln dabei den Ionenfluß entlang des vorherrschenden elektrochemischen Gradientens. Die unterschiedlichen Ionenkanäle sind spezifisch in den prä- oder postsynaptischen Zellkompartimenten der Neuronen lokalisiert (Kandel et al.; 1996).

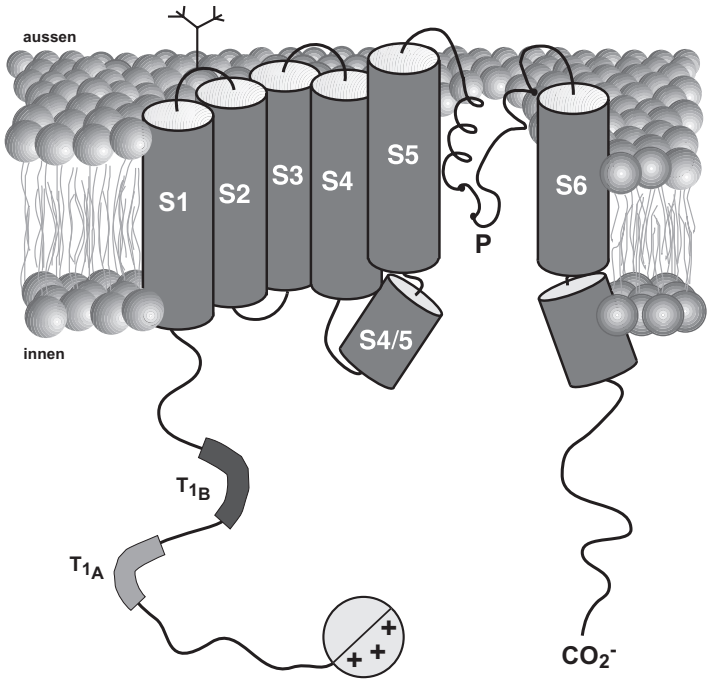
1.1. Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Innerhalb der Klasse der Kalium selektiven Ionenkanäle stellen die spannungsabhängigen K^+-Kanäle (Kv-Kanäle) für sich eine heterogene Proteinfamilie dar. Ein funktionaler Kanal entsteht durch die Tetramerisierung von vier Kv α-Untereinheiten (MacKinnon, 1991; Limann et al., 1992). Die Primärstruktur einer solchen Kv α-Untereinheit ist in Abbildung 1 dargestellt. Charakteristisch für K^+-Kanäle sind die sechs membrandurch-spannenden α-Helices S1 bis S6. Die Kanalpore wird von der extrazellulären Seite durch den mit H5 bezeichneten hydrophoben Loop und von der intrazellulären Seite durch das verbindende Segment zwischen S5 und S6 (in der Abbildung mit S5/6 bezeichnet) sowie dem zytoplasmatisch orientierten Bereich von S6 gebildet (Jan und Jan, 1992; Pongs, 1992; Chandy und Gutman, 1995). Die charakteristische Funktion eines Spannungssensors übt in den Kv-Kanälen das S4-Segment aus. Dort sind an jeder dritten Position innerhalb der Aminosäuresequenz geladene Aminosäuren lokalisiert. Die beiden Proteinenden sind zytoplasmatisch lokalisiert, wobei im aminoterminalen Bereich die für die Tetramerisierung verantwortlichen Domänen (mit T1A und T1B gekennzeichnet)

nachgewiesen worden sind (Li et al., 1992; Shen et al., 1993; Pfaffinger und DeRubeis, 1995).

Für die Kv α-Proteine wurden bisher acht Subfamilien beschrieben, die schematisch mit Kv1 bis Kv8 bezeichnet werden (Chandy et al., 1991). Innerhalb einer jeden Subfamilie sind weitere Mitglieder identifiziert worden. Beispielsweise wurden in der Maus zwölf Mitglieder der Kv1 α-Subfamilie nachgewiesen, entsprechend werden diese mit Kv1.1 α bis Kv1.12 α bezeichnet (Aidley und Stanfield; 1996).

Abbildung 1: **Struktur einer α-Untereinheit eines A-Typ-K^+-Kanals**



Funktional lassen sich die verschiedenen Kv-Kanäle in „schnell-inaktivierende“ (A-Typ) oder „nicht-inaktivierende“ (delayed-rectifier) Kanäle unterteilen. In der Abbildung 1 ist eine α-Untereinheit eines typischen A-Typ-Kanals, dem Kv1.4, dargestellt. Charakteristisch ist die Ballstruktur am N-Terminus. Dieser sogenannte Inaktivierungsball kann mit der inneren Porenöffnung in Wechselwirkung treten, wodurch die Pore blockiert, und der Kanal schnell inaktiviert wird (N-Typ-Inaktivierung; Hoshi et al., 1990; Zagotta et al., 1990; Ruppersberg et al., 1991; Isacoff et al., 1991). Bei einem anderen A-Typ-Kanal, dem Kv4.2, ist die Existenz eines Inaktivierungsballes dagegen noch nicht eindeutig geklärt.

Funktionale K^+-Kanäle werden nicht nur durch die Tetramerisierung von identischen Kv α-Untereinheiten gebildet, sondern können auch durch unterschiedliche α–Untereinheiten einer selben Subfamilie entstehen. Sogar das Assembly von Mitgliedern

verschiedener Subfamilien wird zumindest *in vitro* nachgewiesen. Die durch die verschiedenen α-Untereinheiten gebildeten Kv-Kanäle zeichnen sich durch spezifische kinetische und pharmakologische Eigenschaften aus.

Die hohe Diversität an unterschiedlichen Kv-Kanälen erklärt auch die Vielzahl von Funktionen, die Kv-Kanäle erfüllen. Sie sind nicht nur an der Repolarisation erregter Neurone oder aber der Regulation des Membranruhepotentials von Zellen beteiligt, sondern erfüllen auch wichtige Funktionen bei der neuronalen Informationsverarbeitung (Hille, 1995). Diese Vielzahl an Aufgaben impliziert natürlich auch, daß nicht jedes Gewebe die gleichen Kv-Kanäle exprimiert. So werden im Gehirn zwar alle Kv α-Proteine nachgewiesen, jedoch findet man in den einzelnen Gehirnarealen und auch in den verschiedenen Zelltypen eines selben Areals ein spezifisches Expressionsmuster. Zusätzlich dazu läßt sich für einige Kv α-Proteine eine spezifische subzelluläre Verteilung nachweisen. Beispielsweise werden die beiden A-Typ-Kanäle Kv1.4 und Kv4.2 in gleichen Neuronen des Hippocampus, jedoch in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert. Während das Kv1.4 α-Protein in den axonalen Kompartimenten und präsynaptischen Terminalen lokalisiert ist, wird das Kv4.2 α-Protein im Soma und in besonders hoher Dichte in den distalen dendritischen Ausläufern dieser Neurone nachgewiesen (Sheng et al., 1992; Maletic-Savatic et al., 1995; Veh et al., 1995, Alonso und Widmer, 1997). Die unterschiedliche Verteilung dieser beiden A-Typ-Kanäle innerhalb der gleichen Neurone bedeutet auch eine unterschiedliche Aufgabenverteilung. So ist der Kv1.4 unter anderem an der Modulation von Form und Frequenz von Aktionspotentialen beteiligt, während die hohe Dichte des Kv4.2 in Dendriten dazu führt, daß dort kein Aktionspotential generiert werden kann, oder aber eine Rückkopplung des Aktionspotentials aus dem Axon vermieden wird (Hoffman et al., 1997; Hoffman und Johnston, 1998). An der synaptischen Plastizität dieser Neurone sind vermutlich beide A-Typ-Kanäle beteiligt, jedoch auf den entgegengesetzten Seiten der Synapse.

Die spezifische Expression in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen ist offensichtlich transkriptionell reguliert, dagegen läßt sich die kompartimentspezifische Verteilung innerhalb eines Neurons nur durch einen gerichteten Proteintransport erklären. Da die Kv1.4 und Kv4.2 α-Proteine für sich funktional ähnliche Kanäle bilden und sich im Grunde nur in den zytoplasmatisch orientierten Bereichen unterscheiden, sollten innerhalb dieser Proteinbereiche auch die für einen gerichteten Proteintransport bestimmenden Signale verborgen sein.

1.2. Proteintransport der Kv1.4 α-Untereinheit im Modellsystem

Die Mechanismen, die einem gerichteten Proteintransport der Kv1.4 α-Proteine zu Grunde liegen, sind noch unbekannt. Es wird jedoch vermutet, daß der Einbau in die Membranen des endoplasmatischen Retikulums aufgrund der Hydrophobizität der membrandurchspannenden Segmente geschieht. Von dort gelangen die Proteine, eingebunden in Vesikel, zum Golgi-Apparat. Spätestens im trans-Golgi-Netzwerk kommt es dann zu einer Umverteilung der Proteine. Dabei werden die Proteine, vermutlich aufgrund von determinierenden Sequenz- und/oder Strukturmotiven innerhalb des Proteins, in spezifische Transportvesikel sortiert. Diese sind dann darauf spezialisiert, die Proteine an den Ort ihrer Funktion zu transportieren, an dem sie dann in die Plasmamembran der Zelle eingebaut werden (Hurtley, 1996).

Ein Modellsystem zur Analyse des gerichteten Proteintransportes stellt die heterologe Genexpression in MDCK-Zellen dar (***M**adine **D**arby **C**anine **K**idney*). Diese polaren Epithelzellen verfügen über zwei räumlich voneinander getrennte Membrankompartimente, die apikale und die basolaterale Membran (Rodriguez-Boulan und Sabatini, 1978; Matter und Mellman, 1994). Die Methode des heterologen Gentransfers und der spezifische Nachweis der gerichtet transportierten Proteine läßt sich relativ einfach und kompartimentspezifisch durchführen. So sind für eine Reihe von Membranproteinen die den Transport bestimmenden Proteinsignale identifiziert worden, wobei allerdings bisher kein allgemeingültiges Konzept abgeleitet werden konnte. So ergab die Analyse des Transportverhaltens des Kv1.4 α-Proteins in diesem Modell, daß die Deletion von 73 Aminosäuren am C-Terminus zu einem ungerichteten Proteintransport führte (La Maout, et al., 1996). Weiter konnte die putative, den Transport determinierende, Proteindomäne auf den Bereich von 16 Aminosäuren (Aminosäurebereich 557-573 von insgesamt 646 Aminosäuren im Kv1.4 α-Protein) eingegrenzt werden. Allerdings reicht auch die Mutation einer einzigen Aminosäure (Tyrosin an Position 590) im carboxyterminalen Bereich aus, die Proteinstruktur derartig zu verändern, daß das Protein ebenfalls nicht mehr gerichtet transportiert wird (Bartelsen, 1995).

Ein Nachteil des MDCK-Modells besteht in der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Bedingungen im Neuron. So steht das Transportverhalten des Kv1.4 α-Proteins nicht in Einklang mit der zum MDCK-Modell bestehenden Hypothese. Der Transport in die basolateralen Membranen entspricht danach einer somatodendritischen Orientierung im Neuron. Entsprechend sind axonale und apikale Orientierung einander kompatibel (Dotti

und Simons, 1990; Ikonen et al., 1993; De Hoop et al.; 1995). Es gibt eine Reihe von Proteinen, die diese Unregelmäßigkeit aufweisen, beispielsweise wird das in die Plaquebildung bei Morbus Alzheimer involvierte APP (***a****myloid* ***p****recursor* ***p****rotein*) ebenfalls basolateral bzw. axonal sortiert (Tienari et al., 1996).
Es ist fraglich, ob sich die Polaritäten oder Transportmechanismen zwischen polaren Epithelzellen und neuronalen Zellen wirklich vergleichen lassen.

1.3. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein neuronales Expressionsystem zu etablieren, das in Bezug auf die Analyse eines gerichteten Proteintransportes von bestimmten Kv α-Proteinen den Bedingungen *in vivo* weitestgehend entspricht.

Die Kv1.4 α- und Kv4.2 α-Proteine bilden homologe A-Typ-Kanäle mit vergleichbaren kinetischen Eigenschaften. Da sich ihre Struktur nur im Bereich der zytoplasmatisch orientieren Proteinenden unterscheidet, sollte die nachgewiesene kompartimentspezifische Verteilung der Kanäle durch diese Bereiche determiniert sein. Die Ergebnisse aus dem MDCK-Modell (siehe 1.2.) deuten auf die Existenz einer putativen Transportdomäne innerhalb des zytoplasmatischen C-Terminus hin.
Zur Analyse des gerichteten Proteintransportes dieser beiden Kv α-Untereinheiten wurden Konstrukte entwickelt, die auch in Gegenwart von endogenen Kv1.4 und Kv4.2 α-Proteinen nach einer heterologen Genexpression in einer neuronalen Zelle spezifisch nachgewiesen werden können.
Mit diesen Konstrukten wurde dann eine Methode des Gentransfers etabliert, die eine heterologe Proteinexpression in einem polarisierten Neuron ermöglicht. Dabei fanden die Aspekte einer einfachen Handhabung und der Reproduzierbarkeit der Expressions-ergebnisse Berücksichtigung.

2 Material

2.1. Lösungen und Bakterienmedien (in alphabetischer Reihenfolge)

Blocklösung	10	% (v/v)	Pferdeserum (Fa. Biother) in PBS
(*Immunhistochemie*)	0,2	% (w/v)	Rinderserumalbumin (BSA)
	0,3	% (w/v)	Triton X-100
Denaturierungspuffer	0,5	M	NaOH
(*Southern-Blot*)	1,5	M	NaCl
Denhardt's Reagenz (200 x)	40	g/l	Ficoll 400
(*Southern-Blot*)	40	g/l	BSA
	40	g/l	Polyvinylpyrrolidon
Dextranblau-Lösung	0,01	% (w/v)	Dextranblau
(*DNA-Markierung*)	100	mM	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
	50	% (v/v)	Glycerol
DNA-Probenpuffer (10x)	200	mM	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
(*DNA-Gele*)	40	% (w/v)	Ficoll 400
	0,05	% (w/v)	Xylencyanol ff
Entfärbelösung	30	% (v/v)	Methanol
(*Proteingele*)	10	% (v/v)	Essigsäure
dNTP-Stammlösung	20	mM	pro dATP, dCTP, dGTP, dTTP
(*PCR*)			
Entfärbelösung	30	% (v/v)	Methanol
(*Proteingele*)	1	% (v/v)	Essigsäure
Färbelösung	40	% (v/v)	Methanol
(*Proteingele*)	10	% (v/v)	Essigsäure
	0,1	% (w/w)	Serva Blau R250
Heringssperma-DNA-Lösung	10	mg/ml	Heringssperma in TE-Puffer
(*Southern-Blot*)			

Hybridisierungslösung	6	x	SET-Puffer	
(*Southern-Blot*)	5	x	Denhardt's Reagenz	
	2	% (w/v)	Natriumdodecylsulfat (SDS)	
	50	% (v/v)	Formamid	
Klenow-Puffer (10x)	500	mM	Tris/HCl, pH 7,6	
(*Auffüllreaktion*)	100	mM	$MgCl_2$	
Laufpuffer	25	mM	Tris	
(*SDS-PAGE*)	192	mM	Glycin	
	0,1	% (w/v)	SDS	
LB-Medium	10	g/l	Caseinhydrolysat, pH 7,4	
	10	g/l	NaCl	
	5	g/l	Hefeextrakt	autoklaviert
LB/Amp-Medium	100	µg/ml	Ampicillin in LB-Medium	
LB/Amp-Platten	1	l	LB-Medium	
	15	g/l	Bacto-Agar	autoklaviert
	100	mg/l	Ampicillin	
LB/Kanamycin-Medium	25	µg/ml	Kanamycin in LB-Medium	
LB/Tetracyklin-Platten	1	l	LB-Medium	
	15	g/l	Bacto-Agar	autoklaviert
	25	mg/l	Tetracyklin	
Ligationspuffer (10x)	200	mM	Tris/HCl, pH 7,9	
(*DNA-Ligation*)	100	mM	$MgCl_2$	
	100	mM	Dithiotreitol (DTT)	
	6	mM	ATP	
Lösung I	25	mM	Tris/HCl, pH 8,0	
(*Plasmidisolierung*)	10	mM	EDTA	
	50	mM	D-Glucose	
Lösung II	200	mM	NaOH	
(*Plasmidisolierung*)	1	% (w/v)	SDS	

Lösung III	3	M	KOAc	
(*Plasmidisolierung*)	200	mM	Eisessig, pH 6,0	
Megaprime-Puffer	0,3	mM	Tris/HCl, pH 7,5	
(*DNA-Markierung*)	jeweils 0,1	mM	dATP, dGTP, dTTP	
	50	mM	β-Mercaptoethanol	
	25	mM	$MgCl_2$	
MOPS-Puffer (10x)	200	mM	MOPS, pH 7,0	
(*RNA-Gel*)	10	mM	EDTA, pH 8,0	
	50	mM	NaOAc, pH 4,8	
Neutralisierungspuffer	0,5	M	Tris/HCl, pH 7,4	
(*Southern-Blot*)	1,5	M	NaCl	
PBS (20 x)	3	M	NaCl	
	161	mM	Na_2HPO_4	
	39	mM	KH_2PO_4	autoklaviert
PCR-Puffer (10x)	100	mM	Tris/HCl, pH 9,0	
	500	mM	KCl	
	1	%	Triton X-100	
Polynukleotidkinase-	700	mM	Tris/HCl, pH 7,6	
Puffer (10x)	100	mM	$MgCl_2$	
	5	mM	DTT	
	10	mM	ATP	
Premix-Puffer	25	mM	MOPS-Puffer (10x)	
(*RNA-Gel*)	22,6	% (v/v)	Formaldehyd (37%)	
	64,5	% (v/v)	Formamid	
Probenpuffer (2x)	250	mM	Tris/HCl, pH 6,8	
(*SDS-PAGE*)	5	% (w/v)	SDS	
	10	% (w/v)	β-Mercaptoethanol	
	20	% (w/v)	Glycerol	
	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau oder Pyronin Y	

Puffer PE	70	%	Ethanol
(*DNA-Isolierung*)	100	mM	NaCl
	10	mM	Tris/HCl, pH 7,5
Puffer P1	50	mM	Tris/HCl, pH 8,0
(*Plasmidisolierung*)	10	mM	EDTA
	100	µg/ml	Ribonuklease (RNase) A
Puffer P2	200	mM	NaOH
(*Plasmidisolierung*)	1	% (w/v)	SDS
Puffer P3	3	M	KOAc, pH 5,5
(*Plasmidisolierung*)			
Puffer QBT	750	mM	NaCl
(*Plasmidisolierung*)	50	mM	MOPS, pH 7,0
	15	% (v/v)	Isopropanol
	0,15	% (w/v)	Triton X-100
Puffer QC	1	M	NaCl
(*Plasmidisolierung*)	50	mM	MOPS, pH 7,0
	15	% (v/v)	Isopropanol
Puffer QF	1,25	M	NaCl
(*Plasmidisolierung*)	50	mM	Tris/HCl, pH 8,5
	15	% (v/v)	Isopropanol
Puffer QX-1	3	M	NaI
(*DNA-Isolierung*)	4	M	$NaClO_4$
	10	mM	Natriumthiosulfat
	10	mM	Tris/HCl, pH 7.0
RNA-Probenpuffer	95	% (v/v)	Formamid
(*RNA-Gel*)	0,5	mM	EDTA
	0,025	%(w/v)	SDS
	0,025	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,025	% (w/v)	Xylencyanol ff

Sammelgelpuffer (4x)	500	mM	Tris/HCl, pH 6,8	
(*SDS-PAGE*)	0,4	% (w/v)	SDS	
Sequenase-Puffer (5x)	200	mM	Tris/HCl, pH 7,5	
(*DNA-Sequenzierung*)	100	mM	$MgCl_2$	
	250	mM	NaCl	
Sequenase-Labeling-Mix (zum Einbau von radioaktiv markiertem dATP)				
(*DNA-Sequenzierung*)	7,5	µM	pro dCTP, dGTP, dTTP	
Sequenase-Stop-Mix	20	mM	EDTA	
(*DNA-Sequenzierung*)	95	% (v/v)	Formamid	
	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau	
	0,05	% (w/v)	Xylencyanol ff	
Sequenase-Terminations-Mix (am Beispiel für den ddG-Terminations-Mix)				
(*DNA-Sequenzierung*)	80	µM	pro dGTP, dATP, dTTP, dCTP	
	8	µM	ddGTP	
	50	mM	NaCl	
SET-Puffer (20x)	3	M	NaCl	
(*Southern-Blot*)	400	mM	Tris/HCl, pH 7,4	
	20	mM	EDTA	
SOB-Medium	20	g/l	Caseinhydrolysat	
(*kompetente Bakterien*)	5	g/l	Hefeextrakt	
	0,5	g/l	NaCl	
	10	mM	KCl	autoklaviert
SP6-NTP/CAP-Mix	10	mM	pro ATP, UTP, CTP	
(*in vitro Transkription*)	2	mM	GTP	
	8	mM	Cap-Analogon ($m^7G(5')ppp(5')G$)	
SSC-Puffer (20x)	3	M	NaCl	
(*Southern-Blot*)	300	mM	Natriumzitrat, NaOH pH 7,2	
TAE-Puffer (50x)	2	M	Tris/Acetat, pH 8,0	
(*DNA-Gel-Laufpuffer*)	100	mM	EDTA	

TE-Puffer	10	mM	Tris/HCl, pH 7,9	
	1	mM	EDTA	autoklaviert
TEB-Laufpuffer (10x)	0,89	M	Tris/HCl, pH 7,9	
(*DNA-Sequenzierung*)	0,89	M	Borsäure	
	10	mM	EDTA	
TB-Puffer		3	g/l Pipes, pH 6,7	
(*kompetente Bakterien*)	15	mM	$CaCl_2$	
	250	mM	KCl	
	10,88	g/l	$MgCl_2$	steril filtriert
Transferpuffer I	25	mM	Tris/HCl, pH 7,9	
(*Western-Blot*)	192	mM	Glycin	
	30	% (v/v)	Methanol	
	0,01	% (w/v)	SDS	
Trenngelpuffer (4x)	1,5	M	Tris/HCl, pH 8,8	
(*SDS-PAGE*)	0,4	% (w/v)	SDS	

2.2. Zellkulturlösungen und Medien

Es wurden in der Regel Fertiglösungen der Firmen Gibco BRL (G) und SIGMA (S) verwendet.

BBS-Puffer (2x)		BES gepufferte Lösung		
	50	mM	BES	S
	280	mM	NaCl	S
	1,4	mM	Na_2PO_4/HCl, pH 6,95 (20^0C)	S
HBSS		Hank's gepufferte Kochsalzlösung		G
HBSS-Puffer		Hank's gepufferte Kochsalzlösung		G
	+ 10	mM	HEPES	G

OPTI-MEM I			Serumreduziertes Medium, fl (Modifizierung von MEM mit L-Glutamin, HEPES, 2,4 g/l Na_2CO_3, Natriumpyruvat, Hypoxanthin, Thymidin, Spurenelementen, Wachstumsfaktoren, 1,1 mg/l Phenolrot)		G
PBS			Dulbecco's PBS, fl. (ohne Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na_2CO_3)		G
HEK293	Nährmedium		Dullbecco's MEM/Nutrient Mix F12, fl. (ohne L-Glutamin)		G
		+ 4	mM	L-Glutamin	G
		+ 50	U/ml	Penicillin/Strptomycin	G
		+ 10	% (v/v)	FCS	Biochrom
COS-7	Nährmedium		siehe HEK-293		
CHO	Nährmedium		MEM Alpha Medium, fl. (mit Nukleotiden, L-Glutamin)		G
		+ 4	mM	L-Glutamin	G
		+ 50	U/ml	Penicillin/Streptomycin	G
		+ 10	% (v/v)	FCS	Biochrom
Neuronen	Plating-Medium		MEM, fl. (mit Earle's Salzen, L-Glutamin)		G
		+ 0,6	% (w/v)	Glucose	S
		+ 10	%	Pferdeserum	Biother
Neuronen (Hippocampus)	Nährmedium		MEM, fl. (mit Earle's Salzen, L-Glutamin)		G
		+ 0,6	% (w/v)	Glucose	S
		+ 100	µg/ml	Transferrin	Dianova
		+ 5	µg/ml	Insulin	S
		+ 20	nM	Progesteron	S
		+ 100	µM	Putrescin	S
		+ 30	nM	Natrium-Selenit	S
		+ 1	mM	Natrium-Pyruvat	S
		+ 0,1	% (w/v)	Hühnerei-Albumin	S

L-15 Medium		Leibovitz's L-15, fl. (ohne L-Glutamin)		S
Neuronen Nährmedium (SCG-Neurone)		L-15 Medium (ohne L-Glutamin)		S
	+ 24	mM	$NaHCO_3$	S
	+ 10	% (v/v)	FCS	Biochrom
	+ 38	mM	Glucose	S
	+ 2	mM	L-Glutamin	S
	+ 50	U	Penicillin, Streptomycin	G
	+ 50	ng/ml	NGF (Nerve Growth Factor) 7S	S

2.3. Oligonukleotide

Die Oligonukleotidsynthese wurde bei den Firmen MWG und Pharmacia in Auftrag gegeben. Folgende Oligonukleotide wurden in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als Primer bzw. zur DNA-Sequenzierung der verwendet:

Die mit kleinen Buchstaben wiedergegebenen Nukleotide stehen für degenerierte Positionen des Oligonukleotids.

Namen des Primers	Nukleotidsequenz	Homologie zum
	Klonierung Kv4.2	
Ral5A	GTACACCATCGTCACCATG	(+)-Strang Kv4.2
Shal+1818	AAGGGCACAGAAGAAAGCGAGGC	(+)-Strang Kv4.2
Shal+1896	CGGAATGGGTTACTGAGCAAC	(+)-Strang Kv4.2
Shal+1918	CAACTGCAGTCCTCGGAGGAT	(+)-Strang Kv4.2
Shal+1933	GGATGAACCGGCCTTCGTTAG	(+)-Strang Kv4.2
Ral5B	CATGCAGagcTCTTCAAAGA	(-)-Strang Kv4.2
Shal-2452→(**Xba I**)	Cc**tctAGa**GCTCCCATGCgCgCAGACCTGTGCC	(-)-Strang Kv4.2
Shal-2589	*TCTATGAATCTATGGATATACGGCG (bindet nicht im cDNA-Klon)*	(-)-Strang Kv4.2
Shal-2735	GGGACAGATAATGCACTGGG	(-)-Strang Kv4.2
Shal-2953	TTTGTAGGGTCTGGATTTTCGATAAG	(-)-Strang Kv4.2
	Klonierung Kv1.4/GFP:	
R4GFP5	GCTGTGGAGACTGATGTGATGAGTAAAGGAGAAGAAC	(+)-Strang M1
R4GFP3	GTTCTTCTCCTTTACTCATCACATCAGTCTCCACAGC	(-)-Strang M2
GFP-743	CGGGATCCTTACTTGTATAGTTCATCCAT	(-)-Strang GFP

	Klonierung GFP$_{S65T}$:	
GFP+S65T	GTCACTACTTTCACTTATGGTGTTC	(+)-Strang GFP
GFP-S65T	GAACACCATAAGTGAAAGTAGTGAC	(-)-Strang GFP
	Klonierung Kv4.2/EGFP:	
Ral4A	GTGCGCAGTGTCATGAGTA	(+)-Strang Kv4.2
42EFPP	CGTCAGGGTGTCTGCTTTGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC	(+)-Strang M1
EFP42M	GCTCCTCGCCCTTGCTCACCAAAGCAGACACCCTGACG	(-)-Strang M2
EGFP**E1**H1	CG**GAATTC**ACTTGTACAGCTCGTCC	(+)-Strang EGFP
	Klonierung Kv1.4 in pcDNA3.1:	
R4**H3***NHE1*	CCC**AAGCTT**GCTACCACCATGGAGGTGGCAATGGTGAG	(+)-Strang Kv1.4
R4 #341	TTTCATTTGGGcTTCGAAGCGTAG	(-)-Strang Kv1.4
	Klonierung Kv1.4/EGFP:	
R4 #271	GAACAGACagAtCTGACCCAAA	(+)-Strang Kv1.4
R4**Aat2**M	GAGATTCA**gACgTC**AGTCTCCACAGCC	(-)-Strang M1
EGFP**Aat2**P	CT**GAcGTc**GTGAGCAAGGGCGAGGAGC	(+)-Strang M2
	Klonierung CD$_{(ex+tm)}$/Kv4.2$_{(ct)}$:	
SH-CD4	GTGGTAGATCCGACTGAAGTTGCACCTGACACAGAAGAAGA	(-)-Strang M2
CD4+934	GGTGATGAGAGCCACTCAG	(+)-Strang CD4
CD4+SH	TCTTCTTCTGTGTCAGGTGCAACTTCAGTCGGATCTACCAC	(+)-Strang M1
	Klonierung CD4$_{stop}$:	
CD4Δ42	TCTTCTTCTGTGTCAGG**TGA**ACTTCAGTCGGATCTACCAC	(+)-Strang M1
42ΔCD4	GTGGTAGATCCGACTGAAGT**TCA**CCTGACACAGAAGAAGA	(-)-Strang M2
	Klonierung pSFV- CD$_{(ex+tm)}$/Kv4.2$_{(ct)}$:	
XCD4→(**Acc65 I**)	TAA**GGTACC**CGGAAACCGGGGAGTCCCTTTTAG	(+)-Strang CD4
XERVP→(**EcoR V**)	TCC**GATATC**CACCATGGGTCGGGATCTGTACG	(+)-Strang Xpress
CD4-1132	GGCAGAACCTTGATATTGGAT	(-)-Strang CD4
	Sequenzierprimer:	
767pCMV	GACGCAAATGGGCGGTAGG	(+)-Strang
SFV+7295	GGCCACCTTGGCGAGGGAC	(+)-Strang SFV-1
SFV-7496	GGCTGCAACGGCCAAGGACG	(-)-Strang SFV-1
R4Pend	GGAAAGGGGGATGACAGCG	(+)-Strang Kv1.4

2.4. *E. coli* Bakterienstamm

XL1-Blue recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, ralA1, lac [F'proAB, $lacI^qZ\bullet$ M15, Tn10, $(Tet^r)]^c$, (Fa. Stratagene).

2.5. Bezugsquellen verwendeter Materialien

Wenn im Text nicht explizit erwähnt, wurden Chemikalien, Lösungen und Medien von den Firmen Gibco BRL, Fluka, Merck, Riedel de Haen, Serva oder SIGMA bezogen. Für die enzymatischen Reaktionen wurden Enzyme der Firmen Boehringer Mannheim, GibcoBRL, MBI Fermentas, New England Biolabs, Pharmcia, Promega und SIGMA verwendet.

2.6. Sicherheit und Entsorgung

Bei allen verwendeten Chemikalien wurden die R- und S-Sätze sowie die Entsorgungshinweise der jeweiligen Firmen beachtet, Waren diese nicht vorhanden, so wurden die Chemikalien mit äußerster Vorsicht gehandhabt, als wären sie gesundheitsgefährdend. Organische Lösungen wurden in den entsprechenden Sammelbehältern nach Schadstoffkategorien getrennt.

Biologisches Material und Arbeitsmaterialen, die mit rekombinanten Nukleinsäuren in Kontakt gekommen waren, wurden autoklaviert.

Beim Umgang mit radioaktiven Stoffen wurden die vom Gesetzgeber vorgeschriebenen Sicherheitsvorkehrungen sowie die im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg gültigen Strahlenschutzanweisungen (ZMNH) eingehalten. Radiochemikalien und Materialien, die mit Radioaktivität in Kontakt gekommen waren, wurden gesammelt und vom Hersteller entsorgt.

Lösungen und Materialien, die mit kanzerogenen und mutagenen Stoffen kontaminiert waren, wurden dem Sondermüll zugeführt.

Die gentechnischen Arbeiten wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 des Instituts für Neurale Signalverarbeitung im ZMNH durchgeführt, das bei der Freien und Hansestadt Hamburg in der Umweltbehörde im Amt für Technik und Umweltschutz registriert ist.

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion

(Saiki *et al.*, 1988)

Die Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in einem sterilen Reaktionsgefäß in einem Gesamtvolumen von 20 µl (oder 50 µl) durchgeführt. Dazu wurde zur jeweiligen DNA-Matrize (*Template*: 50 ng Plasmid-DNA, 1 µg genomische DNA oder cDNA-Bibliothek) folgender Ansatz pipettiert:

je 25 pMol der Oligonukleotidprimer,
2 (5) µl PCR-Puffer (10 x Puffer),
0,2 mM dNTP-Stammlösung,
1,5 mM $MgCl_2$ und
1.2 U DNA Polymerase.

Der Ansatz wurde mit Paraffinöl (50 µl) überschichtet. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in einem TrioBlock (Fa. Biometra) oder in einem RoboCycler (Fa. Stratagene) durchgeführt Nach einem ersten Denaturierungsschritt (95°C, 5 min) wurde die DNA in 15-35 Temperaturzyklen mit folgenden Temperaturschritten amplifiziert:

Denaturierung	95°C	30 Sekunden (RoboCykler),	60 Sekunden (Biometra)
Primerhybridisierung	T_m	45 Sekunden (RoboCykler),	60 Sekunden (Biometra)
Synthese	72°C	60 Sekunden pro kb	

Zum Abschluß der Polymerase-Kettenreaktion wurde der Reaktionsansatz in der Regel bei 72°C für 10 min inkubiert.

Der T_m-Wert verwendeter Oligonukleotide wurde nach folgender Näherung berechnet:

$$T_m = \{4\ (G+C) + 2\ (A+T)\} - 4°C$$

Besaßen die verwendeten Primer unterschiedliche T_m-Werte, wurde die Primerhybridisierung bei dem niedrigeren T_m-Wert durchgeführt. Für jede fehlende Basenpaarung zwischen Primer und Template (*missmatch*) wurde der T_m-Wert um 4°C herabgesetzt.

Das PCR-Produkt wurde durch Gelelektrophorese analysiert oder gereinigt und entsprechend weiterverarbeitet.

3.1.2. Restriktionsverdau von DNA

(Sambrook *et al.*, 1989)

Der Reaktionsansatz von 0.5-1 µg DNA wurde mit der doppelt berechneten Menge an Restriktionsendonuklease für 1-2 Stunden der Vorschrift des Herstellers entsprechend (Puffer und Temperatur) inkubiert. Durch die Zugabe von EDTA (Endkonzentration 2 mM) oder Inkubation bei 75°C für 15 min wurde der Restriktionsverdau gestoppt und die entstandenen Fragmente elektrophoretisch getrennt. Bei gleichzeitigem Verdau mit mehreren Enzymen wurden die dafür veränderten Enzymmengen nach Empfehlung des Herstellers eingesetzt. War ein Doppelverdau aufgrund der notwendigen Pufferbedingungen nicht möglich, wurde sequentiell verdaut und zwischen den Restriktionen das erste Enzym durch Hitze inaktiviert sowie eine Mikrodialyse (siehe 3.1.3.) des Reaktionsansatzes durchgeführt.

3.1.3. Mikrodialyse von DNA

Bis zu 50 µl eines Reaktionsansatzes wurden auf einen Mikrodialysefilter (Durchmesser 13 mm, Porengröße 0,025 µm, Fa. Millipore), der in einer Petrischale auf bidestilliertem Wasser schwamm, pipettiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30 Minuten wurde der dialysierte Ansatz abgenommen und entsprechend weiterverarbeitet.

3.1.4. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

(Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Dephosphorylierung wurde der Reaktionsansatz auf 50 mM Tris/HCl (pH 9,0) eingestellt und mit einer Einheit alkalischer Phosphatase pro 50 pMol 5'-Enden bei 37°C für 40 min inkubiert. Die Enzymaktivität wurde durch Hitze inaktiviert (15 min, 75°C) und die dephosphorylierte DNA anschließend durch Gelelektrophorese gereinigt.

3.1.5. Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

(Sambrook *et al.*, 1989)

Der zu phosphorylierende Ansatz wurde mit der entsprechenden Menge Polynukleotidkinase-Puffer versetzt, mit einer Einheit T4 Polynukleotidkinase pro 50 pMol 5'-Enden bei 37°C für 30 min inkubiert und anschließend durch Gelelektrophorese gereinigt.

3.1.6. Auffüllen überhängender 5'-Enden

(Sambrook *et al.*, 1989)

Zum Auffüllen nicht kompatibler, überhängender 5'-Enden von DNA-Fragmenten wurde dem entsprechenden Ansatz nach dem Restriktionsverdau dNTP bis zu einer Konzentration von 125 µM sowie die erforderliche Menge Klenow-Puffer zugegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde mit einer Einheit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert und anschließend durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 2 mM) gestoppt.

3.1.7. Gelelektrophorese von DNA

(Sambrook *et al.*, 1989)

Die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten wurde in horizontalen Agarosegelen in GNA-100 Elektrophoresekammern (Fa. Pharmacia) in 1 x TAE-Puffer durchgeführt. Für das Gel wurde je nach erwarteter Fragmentgröße eine Agarosekonzentration zwischen 0,5 und 2% (w/v) gewählt. Zur UV-Detektion der DNA-Fragmente wurde dem Gel Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,4 µg/ml Gelpuffer zugesetzt. Die zu analysierende DNA-Lösung wurde in dem entsprechenden Volumen DNA-Probenpuffer aufgenommen und in die Probentaschen des Agarosegels pipettiert. Die Dauer der Elektrophorese bei einer Spannung von 90-150 V richtete sich nach den Erfordernissen der jeweiligen Trennung.

3.1.8. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

(QIAGEN QIAEX II Handbook, QIAGEN, 1996; Vogelstein und Gillespie, 1979)

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurden zwei Methoden angewendet, die Adsorption an QIAEX II-Partikel oder die Zentrifugation durch Glaswolle.

Bei der QIAEX II-Methode wurde das DNA enthaltende Gelstück ausgeschnitten, in einem Reaktionsgefäß mit 1 ml Puffer QX-1 versetzt und mit 10 µl sorgfältig resuspendierten QIAEX II-Partikeln (*Zusammensetzung vom Hersteller nicht veröffentlicht*) unter Schütteln bei 50°C für 10 min inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 30 s, 14000 x g), der Überstand abgenommen und der Niederschlag in 0,5 ml Puffer QX-1 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Niederschlag zweimal mit 0,5 ml Puffer PE gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur für 3 min getrocknet. Die DNA wurde durch Inkubation mit 20 µl TE-Puffer bei Raumtemperatur oder für DNA-Fragmente größer als 3 kb bei 50°C für 10 min eluiert und durch Zentrifugation von den QIAEX II-Partikeln getrennt.

Bei der Isolierung mittels Zentrifugation durch Glaswolle wurde das DNA enthaltende Gelstück ausgeschnitten und in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, das vorher mit einem kleinen Loch im Boden versehen und im unteren Drittel mit silanisierter Glaswolle gefüllt worden war. Das 0,5 ml-Reaktionsgefäß wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gestellt und zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 10 min, 10000 x g). DNA sowie Puffer passieren im Gegensatz zur Agarose die Glaswolle und befinden sich dann im 1,5 ml-Reaktionsgefäß.

3.1.9. Ligation von DNA-Fragmenten

(Sambrook *et al.*, 1989)

In einem Reaktionsvolumen von 20 µl wurden 10-30 ng Vektor-DNA mit der dreifachen molaren Menge an Fragment-DNA in Ligationspuffer mit einer Einheit T4-DNA-Ligase bei Raumtemperatur für 1-2 h oder bei 14°C für 12-16 h inkubiert.

3.1.10. Transformation von Bakterien

(Sambrook *et al.*, 1989)

Ein Volumen von 50–100 µl kompetenter (siehe 3.1.11.) Bakterien wurden mit 10-20 µl Ligationsansatz (siehe 3.1.9.) oder 30 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock für 90 sek bei 42°C und Abkühlen für 5 min auf Eis, wurde der Reaktionsansatz auf LB/Amp-Platten (oder in Gegenwart des vom Vektor-Resistenzgens vorgegebenen Antibiotikums) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.11. Herstellung kompetenter Bakterien

(Inoue *et al.*, 1990)

Bakterien des *E. coli*-Stammes XL1-Blue wurden auf einer LB/Tetracyklin-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Es wurden 125 ml SOB-Medium mit 5 Kolonien angeimpft, Magnesium zugesetzt (Endkonzentration: 10 mM $MgCl_2$ und 10 mM $MgSO_4$) und dieser Ansatz bei 22-25°C bis zu einer optischen Dichte von OD_{600}=0,5 kultiviert. Nach Abkühlen (10 min, 0°C) und Zentrifugation (Sorvall RC 28S, Rotor HS-4, 15 min, 4°C, 2500 x g) wurde der Bakterienniederschlag in 40 ml TB-Puffer in der Kälte resuspendiert, weitere 10 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 10 ml TB-Puffer in der Kälte resuspendiert und nach Zugabe von 750 µl Dimethylsulfoxid für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde aliquotiert (200 µl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.
Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen mit einer Plasmidlösung bekannten DNA-Gehaltes (1 ng/µl) transformiert und nach über Nacht Inkubation die Anzahl an Bakterienkolonien bestimmt. Für Transformationsreaktionen wurden ausschließlich kompetente Zellen mit einer Effizienz von mehr als $5x10^7$ Kolonien pro µg Plasmid-DNA verwendet.

3.1.12. PCR aus Einzelkolonien

Zur Selektion positiver Klone wurden einzelne Bakterienkolonien eines transformierten Ligationsansatzes mit einer sterilen Pipettenspitze von der LB/Amp-Platte abgenommen

und in 20 µl bidestilliertem H_2O resuspendiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden 10 µl als DNA-Matrize in einer Polymerase-Kettenreaktion (siehe 3.1.1.) eingesetzt. Bei Nachweis des gewünschten DNA-Fragmentes wurden mit den restlichen 10 µl Bakteriensuspension 70 ml LB-Medium angeimpft.

3.1.13. Plasmid-Isolierung

3.1.13.1. Plasmid-Isolierung aus Kulturen minimalen Volumens

(Le Gouill *et al.*, 1994)

Ein Volumen von 3 ml LB/Amp-Medium wurden mit einer Plasmid tragenden Einzelkolonie des *E. coli*-Stammes XL-1 Blue angeimpft und bei 37°C im Warmluftschüttler (180 UpM) kultiviert. Nach 10–14 h wurden 1,5 ml dieser Bakterienkultur in ein Reaktionsgefäß überführt und bei Raumtemperatur für 2 min zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 6000 UpM). Der Niederschlag wurde in 100 µl Lösung I vollständig resuspendiert und bei Raumtemperatur nacheinander mit 200 µl Lösung II, 200 µl Chloroform und 150 µl Lösung III versetzt. Dieser Reaktionsansatz wurde gut durchmischt und für 2 min zentrifugiert (14000 UpM). Die wäßrige Phase wurde abgenommen und die darin enthaltende Plasmid-DNA mit 0,9 ml Ethanol (absolut) versetzt und sofort bei 4°C für 10 min zentrifugiert (14000 UpM). Das DNA-Präzipitat wurde mit Ethanol (75%) gewaschen, für 3 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 20 µl TE-Puffer gelöst.

3.1.13.2. Plasmid-Isolierung aus 70 ml-Kulturen

(QIAGEN Plasmid Purification Handbook, QIAGEN, 1997)

Es wurden 70 ml LB/Amp-Medium mit einer Plasmid tragenden Einzelkolonie des verwendeten *E. coli*-Stammes angeimpft und 10-14 h bei 37°C im Warmluftschüttler (180 UpM) inkubiert. Die Bakterienkultur wurde für 10 min zentrifugiert (15 min, 4°C, 6000 x g, Tischzentrifuge 2K15, Fa. Sigma). Das Bakterienpräzipitat wurde in 4 ml Puffer P1 resuspendiert, mit 4 ml Puffer P2 versetzt und durch Invertieren (5x) des Reaktionsgefäßes durchmischt. Nach einer Inkubationsphase von 5 min bei Raumtemperatur wurden 4 ml Puffer P3 (4°C) zugesetzt, durch Invertieren durchmischt und weitere

5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 4°C für 30 min zentrifugiert (30000 x g) und der Überstand auf eine mit 2 ml Puffer QBT äquilibrierte QIAGEN-tip 100-Säule gegeben. Die Säulen wurden im freien Fluß ohne Pumpe gefahren. Nach zwei Waschschritten mit jeweils 4 ml Puffer QC wurde die Plasmid-DNA mit 3 ml Puffer QF eluiert, durch Zugabe von 2,1 ml Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (30000 x g) bei 4°C für 30 min präzipitiert. Der DNA-Niederschlag wurde mit 1,5 ml Ethanol (70%) gewaschen, für 3 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Bevor die Reinheit und Ausbeute durch Photometrische Quantifizierung (siehe 3.1.14.) oder durch Gelelektrophorese (siehe 3.1.7.) bestimmt wurde, war die DNA-Lösung durch erneutes Umfällen in Ethanol ein weiteres Mal gereinigt worden.

3.1.4. Photometrische Quantifizierung von DNA

Die Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen wurde durch Messen der relativen Lichtabsorption bei 260 und 280 nm photometrisch bestimmt. Dazu wurden die DNA-Lösungen in einer Verdünnung von 1:250 und 1:500 mit TE-Puffer versetzt und die relative Absorption in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 mm, Probenvolumen 100 µl) gemessen (Gene Quant RNA/DNA Calculator, Fa. Pharmacia).
Für einzelsträngige Oligonukleotide wurde der Verdünnungsfaktor mit dem Faktor

$$1\ OD_{260(\text{optische Dichte bei 260 nm})} = 33\ \mu g/ml$$

multipliziert, während für doppelsträngige DNA der Faktor

$$1\ OD_{260} = 50\ \mu g/ml$$

verwendet wurde. Zur Abschätzung der Reinheit wurde der Quotient der relativen Absorptionen von 260 nm/280 nm gemessen.

3.1.15. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten zur Hybridisierung

(Feinberg und Vogelstein, 1983 und 1984; Amersham Megaprime DNA Labeling Kit, Instruction Manual, Amersham, 1995)

Radioaktive DNA-Sonden wurden mit Hilfe von statistisch zufälligen Nonanukleotiden hergestellt. Dazu wurden 20-50 ng DNA-Fragment in 12,5 µl bidestilliertem Wasser mit

2,5 µl Nonamer-Mix versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 5 µl Megaprime-Puffer, 2,5 µl α^{32}P-dCTP-Lösung (50 µCi) sowie einer Einheit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) wurde der Ansatz für 20 min bei 37°C inkubiert. Nachdem die Reaktion durch Zugabe von 12,5 µl Dextranblau-Lösung gestoppt worden war, wurden nicht inkorporierte Nukleotide durch Gelfiltration (Sephadex-G75, Säule 10 cm x 0,25 cm^2) abgetrennt und der Einbau der Radionukleotide durch Messung der Cerenkov-Strahlung eines 2 µl-Aliquots kontrolliert.

3.1.16. Southern-Blot-Analyse nach Gelelektrophorese

(Sambrook *et al.*, 1989; Southern, 1975)

Die DNA wurde nach der Elektrophorese in der Agarosegelmatrix für 15 min bei Raumtemperatur denaturiert (Denaturierungspuffer), der pH der Gelmatrix wieder neutralisiert (Neutralisierungspuffer) und durch beidseitigen Kapillarblot (10x SSC-Transferpuffer) über Nacht auf zwei Nylonmembranen transferiert. Diese wurden für 5 min auf mit Neutralisierungspuffer getränktes Filterpapier gelegt und anschließend die transferierte DNA durch UV-Licht (1200 mJ, UV Stratalinker 1800, Fa. Stratagene) auf den Nylonmembranen immobilisiert. Jede Membran wurde mit 10 ml Hybridisierungslösung blasenfrei in ein Hybridisierungsrohr gelegt, mit 100 µl denaturierter Heringsperma-DNA-Lösung versetzt und für 1-2 h bei 42°C prähybridisiert (rotierender Hybridisierungsofen, Fa. Appligene). Zur Hybridisierung wurde die Prähybridisierungslösung abgenommen und der denaturierte (1 min, 100°C; 3 min, 0°C), radioaktiv markierte Hybridisierungsansatz zugegeben. Nach der Hybridisierung (3 h bis maximal über Nacht, 42°C) wurde der Überstand entsorgt und die Membran im Hybridisierungsrohr gewaschen (20 ml 1x SET-Puffer + 0,1% (w/v) SDS). Anschließend wurde die Membran aus dem Hybridisierungsrohr genommen und mehrfach mit steigender Stringenz gewaschen (1 x 20 min, 50°C, 0,5 x SET-Puffer + 0,1% (w/v) SDS; mindestens 2 x 15 min, 60°C, 0,1 x SET-Puffer), bis in der Waschlösung keine Radioaktivität mehr detektiert werden konnte. Die Hybridisierung wurde durch Autoradiographie (Film: XAR5, Fa. Kodak, Verstärkerschirm: Cronex Hi^+, Fa. DuPont) sichtbar gemacht. Die Autoradiogramme wurden nach 4-14 h Belichtungsdauer automatisch (Automatischer Entwickler Curix 60, Fa. AGFA) entwickelt.

3.1.17. DNA-Sequenzierung

(Sanger et al.; 1977)

Die DNA-Sequenzierungen wurden entweder selbst von Hand oder aber durch Beauftragung der dafür zuständigen Servicegruppe des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg automatisch durchgeführt.

3.1.17.1. Manuelle DNA-Sequenzierung

(Step-by-Step protocols for DNA-sequencing with Sequenase-Version 2.0, 5^{th} ed., USB, 1990)

Zur Sequenzierung doppelsträngiger DNA wurden 6 µl Plasmid DNA-Lösung (siehe 3.1.13.) mit 4 µl 1 M NaOH für 15 min bei 37°C denaturiert und nach Zugabe von 7 µl bidestilliertem Wasser, 3 µl 3 M Natriumacetat (pH 4.8) sowie 65 µl Ethanol (absolut) für 30 min bei -70°C gefällt. Der Niederschlag wurde 25 min bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 15000 x g), mit 500 µl Ethanol (80%) gewaschen, 2 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 7 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen. Direkt im Anschluß wurde die DNA-Lösung mit 1 µl Sequenzierprimer (1,4 pMol) sowie 2 µl Sequenase-Puffer versetzt und nacheinander 2 min bei 50°C, 15 min bei 37°C, 5 min bei Raumtemperatur und 10 min bei 0°C inkubiert. Für die Sequenzierungsreaktion wurden pro Nukleotid 2,5 µl Sequenase-Terminations-Mix in Mikrotiterplatten vorgelegt. 10 µl der vorbereiteten Plasmid-DNA-Lösung wurden mit 1 µl Dithiotreitollösung (0,1 M), 2 µl Sequenase-Labeling-Mix (1:5 verdünnt), 0,5 µl [α^{35}S]dATP-Lösung und 2 µl Sequenase 2.0-Lösung (1:8 verdünnt, entspricht 3,25 U) versetzt, 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in 3,5 µl-Aliquots zu dem vorgelegten Terminations-Mix gegeben. Nach einer Inkubation von genau 5 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 4 µl Sequenase-Stop-Mix beendet. Die Proben wurden für 6 min bei 80°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (Macrophor, Fa. Pharmacia.) unter folgenden Bedingungen aufgetrennt: Geldicke 0,2-0,4 mm (Gradientengel), Acrylamid 4% (w/v), Bisacrylamid 0,2% (w/v), Harnstoffkonzentration 8 M, 55°C, 2500V, TEB-Laufpuffer, 30 Minuten Vorlauf, Probenvolumen 2,5 µl. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in Essigsäure fixiert (30 min, 10% (v/v)),

mit Ethanol gewaschen, unter Vakuum für 1 h bei 80°C getrocknet und über Nacht autoradiographiert.

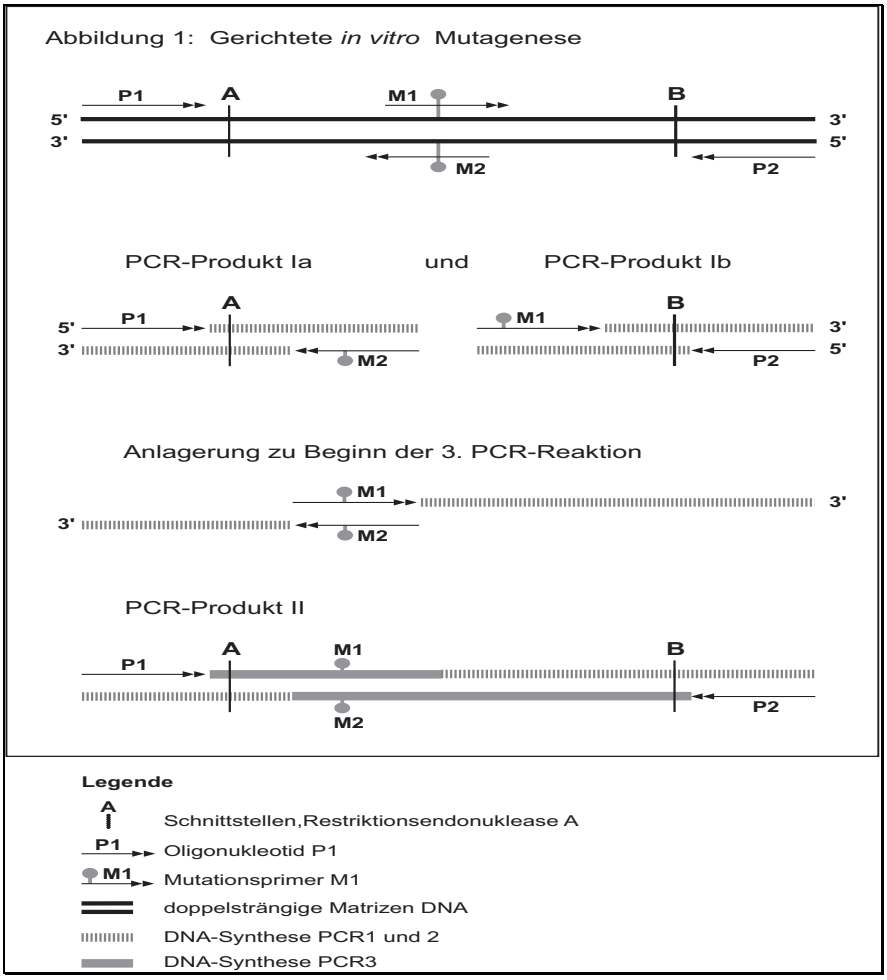
3.1.17.2. Automatische DNA-Sequenzierung

Die automatische Sequenzierung von doppelsträngiger DNA wurde vom Sequenzierservice des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg mit einem ABI PRISM^{TM}-System (Fa. Perkin Elmer) durchgeführt.

3.1.18. Gerichtete *in vitro* Mutagenese von DNA durch PCR

(Higuchi *et al*., 1988; Herlitze *et al*., 1990; Rashtchian *et al*., 1992)

Bei der angewandten Methode zur gerichteten *in vitro* Mutagenese (Abbildung 1) wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenrekation Punktmutationen in ein DNA-Fragment eingeführt. Dabei wurden mit zwei komplementären Oligonukleotiden (M1 und M2), die an der gewünschten Position den Basenaustausch enthielten und zwei spezifischen Oligonukleotiden (P1 und P2) aus dem in 3‘-Richtung liegenden Bereich der zu mutierenden Position, zwei separate Polymerase-Kettenreaktionen durchgeführt. Die erhaltenden DNA-Fragmente (Ia und Ib) beider Reaktionen wurden durch Phenol- und Chloroformextraktion sowie Ethanolfällung aufgereinigt. In einer dritten Polymerase-Kettenreaktion wurden jeweils 50 ng dieser DNA-Fragmente durch zwei initial durchgeführte Temperaturzyklen (Zyklus: Denaturierung 5 min 95°C, Anealing 3 min 45-60°C, Synthese 4 min 72°C) in ihrem überlappenden Bereich aneinander gelagert, ein doppelsträngiges DNA-Molekül synthetisiert, das anschließend durch Zugabe der spezifischen Oligonukleotide (P1 und P2) amplifiziert wurde. Das Reaktionsprodukt (II) wurde durch Phenol- und Chloroformextraktion sowie Ethanolfällung aufgereinigt. Die Lage der spezifischen Oligonukleotide P1 und P2 war so gewählt worden, daß innerhalb des amplifizierten DNA-Fragmentes zwei singuläre Restriktionsschnittstellen (A und B) zur Klonierung des mutierten Bereiches in den ursprünglichen Vektor zur Verfügung standen.



3.1.19. Herstellung der verwendeten rekombinanten Klone

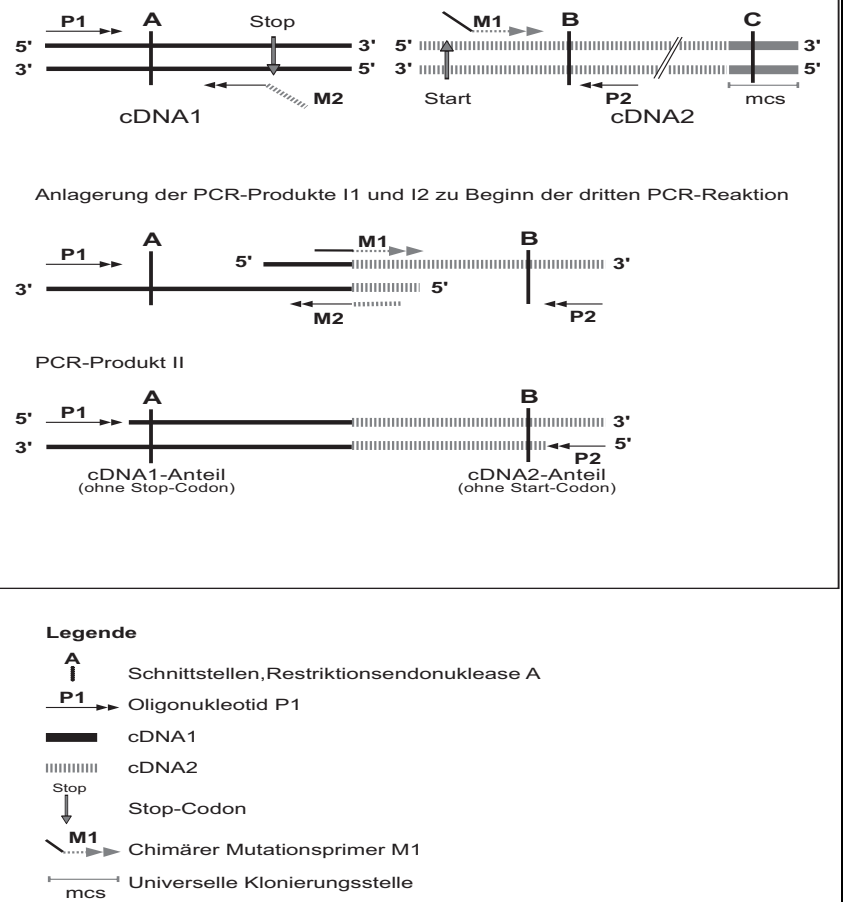
Zur Klonierung der chimären Genprodukte aus CD4-Rezeptor- und Kv1.4- bzw. Kv4.2-cDNA (siehe 4.4.) sowie bei der Herstellung der fusionierten Genprodukte aus Kv1.4 bzw. Kv4.2 und EGFP (siehe 4.2.) wurde eine modifizierte Variante der gerichteten *in vitro* Mutagenese angewandt (Abbildung 2).

Hier wurden die komplementären Mutationsoligonukleotide (M1 und M2) so gewählt, daß sie mit mindestens 18 Basen Homologie zur ersten und mit mindestens weiteren 18 Basen Homologie zur zweiten cDNA besaßen. Bei der Klonierung der EGFP-Chimären wurde das Startcodon des EGFP (ATG) sowie das Stopcodon der Kaliumkanäle deletiert.

Mit den spezifischen Oligonukleotiden (P1 und P2) sowie den Mutationsprimern wurden entsprechend der gerichteten *in vitro* Mutagenese zwei separate Polymerase-Ketten-reaktionen durchgeführt, jedoch auf unterschiedlichen Matrizen-DNAs (cDNA1 und cDNA2).

Die erhaltenden DNA-Fragmente (I1 und I2) beider Reaktionen wurden entsprechend gereinigt und zusammen als Matrizen-DNA in der dritten Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Das Reaktionsprodukt (II) wurde nach Aufreinigung mit den Restriktionsendonukleasen (A und B) verdaut. Dieses rekombinante DNA-Fragment wurde zusammen mit einem weiteren DNA-Fragment aus einer der ursprünglichen cDNAs, das durch Restriktion an den Positionen A oder B und C erhalten worden war, in den ursprünglichen Vektor kloniert (Drei-Fragmente-Ligation). (*In der Klonierungsstrategie nach Abbildung 2 wurde das zweite DNA-Fragment durch Restriktion an den Positionen B und C aus der cDNA2 erhalten. Schneidet das Enzym C die DNA innerhalb der universellen Klonierungsstelle eines Vektors, können die beiden Fragmente unter Umständen in die ursprüngliche cDNA1 subkloniert werden.*

Abbildung 2: Herstellung der rekombinanten Klone



Legende

- A — Schnittstellen, Restriktionsendonuklease A
- P1 — Oligonukleotid P1
- cDNA1
- cDNA2
- Stop — Stop-Codon
- M1 — Chimärer Mutationsprimer M1
- mcs — Universelle Klonierungsstelle

3.1.20. RNA-Techniken

Alle Arbeiten mit RNA wurden entsprechend mit sterilen Geräten und Reaktionsgefäßen sowie Ribonuklease freien Reagenzien durchgeführt. Glasgeräte wurden über Nacht bei 240°C ausgebacken und wäßrige Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (0,01% (v/v)) über Nacht behandelt und anschließend autoklaviert.

3.1.20.1. RNA-Synthese durch Transkription

(mMESSAGE mMACHINE^{TM}, Instruction Manual, Ambion, 1994)

Von dem zu transkribierenden DNA-Fragment wurden 2-3 µg mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease linearisiert, mit Phenol und Chloroform extrahiert und anschließend mit absoluten Ethanol (Endkonzentration 75%) in der Gegenwart von 0,3 M Natriumacetat (pH 5,0) präzipitiert. Nach Zentrifugation (14000 x g) für 15 min bei 4°C wurde der Niederschlag mit 500 µl Ethanol (75%) gewaschen, das DNA-Pellet für 2 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 6,3 µl Wasser gelöst. Davon wurden 0,3 µl zur Kontrolle der Linearisierung elektrophoretisch (siehe 3.1.7.) analysiert. Die verbleibenden 6 µl DNA-Lösung wurden der Reihenfolge nach mit 2 µl Transkriptions-Puffer (*Zusammensetzung vom Hersteller nicht veröffentlicht*), 10 µl SP6-NTP/CAP-Mix sowie 2 µl SP6-RNA-Polymerase-Mix (*Zusammensetzung vom Hersteller nicht veröffentlicht*) 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zusatz einer Einheit Desoxyribonuklease (DNAse) I wurde der Reaktionsansatz weitere 15 min bei 37°C inkubiert, bevor die synthetisierte RNA für 5 min auf Eis präzipiziert wurde (siehe oben). Nach Zentrifugation für 15 min bei 4°C wurde das RNA-Pellet gewaschen, getrocknet und in 100 µl Wasser aufgenommen. Von dieser RNA-Lösung wurden 5 µl abgenommen und elektrophoretisch (siehe 3.1.20.2.) analysiert. Die RNA in den restlichen 95 µl wurde erneut mit Ethanol (absolut) in Gegenwart von 0,3 M Natriumacetat versetzt und bei -20°C gelagert.
In Abhängigkeit zur im Plasmid vorhandenen RNA-Polymerase-Bindestelle wurde die RNA-Synthese auch mit der T7-RNA-Polymerase und den entsprechenden Puffern durchgeführt.

3.1.20.2. Gelelektrophorese von RNA

(Sambrook *et al.*, 1989)

Ein Volumen von 5 µl RNA-Lösung wurde mit 19,4 µl Premixpuffer versetzt und für 5 min auf 65°C erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Eis wurden 5 µl RNA-Probenpuffer zugegeben. Die RNA-Probe wurde in einem horizontalen Agarosegel (0,8% (w/v)) unter Zusatz von 2,2 M Formaldehyd sowie 10% (v/v) Formamid mit MOPS-Puffer als Laufpuffer elektrophoretisch getrennt (Vorlauf: 10 min, 60 V; Lauf: 90 min, 80 V). Das Gel wurde im Laufpuffer mit Ethidiumbromid (0,8 µg/ml Laufpuffer) für 30 min gefärbt und die Hintergrundfärbung anschließend durch wiederholtes Waschen in bidestilliertem Wasser entfernt.

3.2. Proteinchemische Methoden

3.2.1. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Proteine und Proteingemische wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in Mini-Protean II Elektrophoresezellen (Fa. BioRad) analysiert. Auf das polymerisierte Trenngel (Höhe 4,5 cm, Dicke 0,75 bzw. 1,5 mm, 10-15% (v/v) Acrylamid (Acrylamid : Bisacrylamid, 30:0,8), 1x Trenngelpuffer, 1 mg/ml Ammonuimperoxodisulfat, 1 µl/ml N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)) wurde das polymerisierende Sammelgel (0,8 cm Höhe, 3% (v/v) Acrylamid (Acrylamid : Bisacrylamid, 30:0,8), 1x Sammelgelpuffer, 1 mg/ml Ammonuimpersulfat, 1,6 µl/ml TEMED) gegeben. In der Regel wurde das Gel nach einer Polymerisationsdauer von 30 min verwendet. Probentaschengröße und Geldicke richteten sich nach dem zu analysierenden Probenvolumen. Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 95°C oder für 15 min bei 56°C erhitzt, für 10 min zentrifugiert (14000 x g) und in die Probentaschen des Gels überführt. Nach einer Einlaufphase von 30 min bei einer konstanten Stromstärke von 15 mA wurde die Elektrophorese bei 20 mA durchgeführt bis der Farbstoff des Probenpuffers die Unterkante des Trenngels erreicht hatte.

3.2.2. Western-Blot-Analyse

(Ausubel *et al.*, 1996)

3.2.2.1. Elektrophoretischer Transfer

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel für 10 min bei Raumtemperatur im Transferpuffer I äquilibriert und anschließend frei von Luftblasen auf eine feuchte Nitrocellulose-Membran (0,45 µm, Fa. Protran Nitrocellulose BA 85) oder alternativ auf eine mit Methanol befeuchtete PVDF-Membran (0,2µm, Fa. Trans-Blot) gelegt. Der Transferstapel (Schwamm, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier, Schwamm) wurde unter Transferpuffer I zusammengebaut und in die Blotkammer (Mini Trans-Blot Transferzelle, Fa. BioRad) gestellt. Der elektrophoretische Transfer wurde für 120 min bei 200 mA unter Eiskühlung durchgeführt. Nach Beendigung des elektrophoretischen Transfers wurde die Membran mit H_2O gespült und entweder gefärbt (siehe 3.2.2.2.) oder die spezifischen Proteine durch ein Immunoprinting (siehe 3.2.2.3.) detektiert.

3.2.2.2. Membranfärbetechniken

Die Qualität des elektrophoretischen Transfers wurde durch Anfärbung immobilisierten Proteine mit PonceauS-Lösung (0,2% (v/v)) in 3% Trichloressigsäure (v/v)) kontrolliert.
Zur Anfärbung der Proteingewichtsmarker wurden die entsprechenden Spuren von der Membran abgeschnitten und durch Inkubation mit Färbelösung für 15 min bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließende wurden diese Membranstreifen solange mit Entfärbelösung behandelt, bis die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund unterschieden werden konnten.

3.2.2.3. Immunoprinting und ECL-Detektion

(Ausubel *et al.*, 1996 und ECL-Detektion, Herstellerangaben, Amersham International, 1996)

Die Membran wurde nach beendetem elektrophoretischen Transfer der Proteine in PBS kurz äquilibriert und für mindestens 1 h bei Raumtemperatur mit Blockpuffer (PBS mit 5%

(w/v) Magermilchpulver) unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Blockpuffer erneuert und der primäre Antikörper in geeigneter Verdünnung dazugegeben. Die Inkubation mit dem primären Antikörper wurde unter Schütteln für mindestens 2 h bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Membran wurde viermal 5 min mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen, bevor der sekundäre mit Meerrettichperoxidase gekoppelte Antikörper verdünnt in PBS auf die Membran pipettiert wurde. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 40 min bei Raumtemperatur wurde die Membran erneut viermal 5 min mit PBS gewaschen, mit Filterpapier überschüssige Feuchtigkeit abgesogen und mit Chemilumineszenzlösung (1:1 Mischung aus den ECL-Detektionslösungen I und II, *Zusammensetzung vom Hersteller nicht spezifiziert*) bedeckt. Nach genau 1 min wurde der Überstand abgenommen, die überschüssige Feuchtigkeit abgesogen und die Membran sorgfältig mit Folie abgedeckt. Je nach Signalintensität wurde bei Verwendung von Hyperfilm-ECL (Fa. Amersham) zwischen 10 s und 30 min exponiert. Die Filme wurden automatisch entwickelt.

3.3 Zellkultur

3.3.1. Gewebekultur (Lindl und Bauer, 1989)

Die in dieser Arbeit wurden die folgenden Zellinien verwendet:

- HEK293 (***H**uman **E**mbryonic **K**idney*; Typenbeschreibung nach der **A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection (ATCC, 1998): CRL-1573; Graham *et al*., 1977).
- CHO (***C**hinese **H**amster **O**varian*; Typenbeschreibung nach der ATTC: CRL-9096 Stanley und Siminovitch, 1977).
- COS-7 (Affennierenzellen aus *Cercopithecus aethiops*; Typenbeschreibung nach der ATTC: CRL-1651; Gluzman, 1981).

Die Zellinien wurden in den entsprechenden Nährmedien (Zusammensetzung der zellspezifischen Medien siehe 2.2.) in Gegenwart von 10% FCS (***f**etal **c**alf **s**erum*) unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO_2, 90% relativer Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Dazu wurden Standard 50 ml Kulturflaschen (Fläche: 25 cm^2, Fa. Nunc) mit 10 ml Mediumüberstand oder aber Kulturschalen (d = 90mm; Fläche: 56,7 cm^2; Fa. Nunc) mit 8 ml Mediumüberstand verwendet.

3.3.1.1. Umsetzen der Zellen

Die Zellen wurden bei Erreichen einer konfluenten, zweidimensionalen Bedeckung des Zellkulturgefäßes umgesetzt (alle 3-4 Tage). Dazu wurde das überstehende Medium (konditioniertes Medium) abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS (frei von Ca^{2+}/Mg^{2+}-Ionen) gewaschen und für 2-5 min mit Trypsin (0,25 (w/v) pro ml Kultur) behandelt. Durch Zugabe von frischem Nährmedium wurde das Trypsin inhibiert, die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vom Zellkulturgefäß gelöst und für 10 min bei 1000 UpM (Minfuge, Fa. Haereus) zentrifugiert. Nachdem das überstehende Medium verworfen worden war, wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 10^{5-6} Zellen pro 10 ml Kultur in Gegenwart von 10% konditioniertem Medium neu ausgesät.

3.3.2. Neuronenkultur

(Banker und Goslin, 1991)

3.3.2.1. Reinigung der Deckgläser

Dissoziierte Neuronen wurden auf Deckgläsern kultiviert. Als Deckgläser wurden runde Glasplättchen (d = 12 mm) verwendet. Diese wurden in einem Porzellanständer unter vorsichtigem Rühren der Reihenfolge nach 1 h in 2 M NaOH, dreimal 1 h in bidestilliertem H_2O und über 3 Tage in 70% oder 100% HNO_3 inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Deckgläser zehnmal 10 min mit bidestilliertem H_2O gewaschen, 1 h bei 60^0C getrocknet und für mehrere Stunden bei 220^0C gebacken.

3.3.2.2. Beschichtung der Deckgläser

Die Deckgläser wurden aus dem Ofen entnommen und einzeln in die Löcher einer sterilen 24-Loch-Mikrotiterplatte gelegt. Dort wurden sie mit Poly-D-Lysin (1 mg/ml in PBS, Fa. LifeTechnologies) überschichtet und über Nacht bei 4^0C inkubiert. Das Poly-D-Lysin wurde so abgesaugt, daß auf den Deckgläsern etwas Restflüssigkeit blieb. Anschließend

wurde zweimal 2 h mit bidestilliertem H_2O gewaschen und eine zweite Beschichtung mit Laminin (10 µg/cm^2, Fa. LifeTechnologies) oder Fibronektin (5 µg/cm^2, Fa. LifeTechnologies) durchgeführt. Am Ende wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen und bei 4^0C gelagert.

Etwa 1 h vor der Präparation wurde die überstehende Flüssigkeit abgesaugt, dreimal mit PBS gespült, mit Plating-Medium bedeckt und bis zum Ausplattieren der Neurone im Brutschrank bei 37^0C vorgewärmt.

Alternativ wurden die Deckgläser zusätzlich mit Matri-Gel (Basement Membrane Matrigel^R, Fa. Boehringer Ingelheim) beschichtet.

Für das Beschichten der Deckgläser mit Matri-Gel wurden diese 20 min vor dem Ausplattieren der Neurone ebenfalls dreimal mit PBS gespült. Anschließend wurde auf ein Deckglas ein Tropfen frisch aufgetauter und kalter Matri-Gel-Lösung gegeben. Ein zweites Deckglas wurde mit der Poly-D-Lysin-beschichteten Seite auf das erste Deckglas gelegt, so daß die Matri-Gel-Lösung zwischen den beiden Deckgläsern gleichmäßig dünn verteilt wurde. Die beiden aufeinanderliegenden Deckgläser wurden wieder getrennt und in die Mikrotiterplatte überführt, die im Brutschrank bei 37^0C gelagert wurde.

Bei der Verwendung von sterilen CELLocates (Fa. Eppendorf) anstelle von Glasplättchen wurde nur mit Laminin beschichtet. Dazu wurden die CELLocates 2 h vor Präparationsbeginn dreimal mit PBS gespült, mit Laminin beschichtet und bei 37^0C inkubiert. Etwa 20 min vor dem Ausplattieren der Neurone wurde das überstehende Laminin abpipettiert, die Deckgläser dreimal mit Plating-Medium gespült, anschließend mit Plating-Medium bedeckt und im Brutschrank bei 37^0C gelagert.

3.3.3. Präparation primärer hippocampaler Neurone

Diese Neuronen wurden aus dem Hippocampus der Ratte präpariert und waren embryonalen Ursprungs. Es wurden ausschließlich Wistar Ratten, die von der Tierhaltung des Universitäts-Krankenhauses-Eppendorf zur Verfügung gestellt wurden, verwendet.

Trächtige Ratten im Schwangerschaftsstadium E18 wurden mit Halothan (Fa. Hoechst) betäubt und unter vollständiger Narkose dekapitiert. Die Embryonen wurden durch Kaiserschnitt aus dem Uterus des toten Muttertieres entnommen und in eine sterile Petrischale (d = 12 cm), deren Boden mit HBSS bedeckt war, überführt.

Den Embryonen wurde der Kopf abgeschnitten, das gesamte Gehirn herauspräpariert und in HBSS getaucht. Die beiden Hirnhälften wurden getrennt und die gesamte Pia mater der Hemisphären abgezogen und verworfen. Die beiden Hippocampi wurden vorsichtig herausgeschnitten, zerkleinert und in HBSS gepufferte Trypsinlösung (0,25% (w/v)) überführt. Die Hippocampi wurden für 45 min bei 37^0C mit der Trypsinlösung behandelt und anschließend mit HBSS gewaschen. Zur Dissoziation der Neuronen vom Gewebe wurde mit feuerpolierten Pasteuerpipetten (mit abnehmenden Spitzendurchmesser) so lange trituriert, bis keine Gewebestücke mehr erkennbar waren. Die Zelldichte dieser Zellsuspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Mit Platingmedium wurde die gewünschte Zelldichte eingestellt und so auf die behandelten Deckgläser ausgesät, daß eine Zelldichte von 1-3x10^5 Zellen pro cm^2 erreicht wurde. Das Platingmedium wurde frühestens nach 3 h oder spätestens nach 18 h gegen Nährmedium ausgetauscht.

3.3.4. Präparation primärer Neurone des peripheren Nervensystems

Es wurden die Neuronen aus den oberen Zervikalganglien (***s**uperior **c**ervical **g**anglion*, entsprechend auch SCG-Neuronen genannt) der Ratte präpariert Diese Neuronen des peripheren Nervensystems waren postnatalen Ursprungs und entstammten ausschließlich aus Wistar Ratten, die von der Tierhaltung des Universitäts-Krankenhauses-Eppendorf zur Verfügung gestellt wurden.

Drei Jungtiere im Alter von P15 bis P17 wurden mit Halothan betäubt und unter vollständiger Narkose dekapitiert. Die oberen Zervikalganglien, die auf der Gabelung der Halsschlagader lokalisiert sind, wurden herausgeschnitten und in L-15-Medium getaucht. Diese wurden von Geweberesten befreit. Die Ganglien besitzen eine feine Extrahaut, die durch vorsichtiges Zupfen mit einer spitzen Pinzette entfernt wurde. Die nackten Zervikalganglien wurden jeweils in vier gleich große Stücke geschnitten und zweimal mit HBSS-Puffer gewaschen. Die Ganglienstücke wurden nacheinander für 15 min bei 37^0C mit Kollagenase-Lösung (400 U/ml HBSS-Puffer) behandelt, zweimal mit HBSS-Puffer gewaschen und für weitere 30 min bei 37^0C mit Trypsin-Lösung (1% (w/v) in HBSS-Puffer) behandelt. Anschließend wurden die enzymbehandelten Ganglienstücke in 2 ml Nährmedium überführt und durch Trituieren mit feuerpolierten Pasteurpipetten (mit abnehmenden Spitzendurchmesser) dissoziiert. Durch Zentrifugieren bei 2000 UpM

(Minifuge, Fa. Haereus) für 2 min wurden die freigesetzten Neurone sedimentiert. Der Überstand wurde weitestgehend abgenommen und die sedimentierten Neurone in 1 ml Nährmedium resuspendiert. Dichte und Zustand dieser Zellsuspension wurde mikroskopisch analysiert. Ein Tropfen dieser Zellsuspension wurde zentral auf die beschichteten Deckgläser (oder CELLocates) pipettiert. Die Kulturen wurden für 3 h unter Standardbedingungen (37^0C, 5% CO_2, 95% relative Luftfeuchtigkeit) kultiviert, bis 2 ml frisches Nährmedium zugeführt wurde. Aus den sechs oberen Zervikalganglien der drei Jungtiere wurden in der Regel zehn primäre SCG-Kulturen hergestellt.

3.3.5. Kultivierung der primären Neuronenkulturen

Die hippocampalen und SCG-Neuronen wurden bei 37^0C, 5% CO_2 und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach 3 Tagen in Kultur wurde der erste Mediumwechsel durchgeführt. Dabei wurden zwei Drittel des Mediumüberstandes gegen frisches, auf 37^0C vorgewärmtes Nährmedium ausgetauscht. Weitere Mediumwechsel wurden alle 5-6 Tage durchgeführt.

Zur Unterdrückung des Wachstums von nicht neuronalen Zellen (Gliazellen und Fibroblasten) wurde in Kulturen, die länger als 8 Tage kultiviert werden sollten, beim ersten und bei jedem zweiten Mediumwechsel 1 bis 1,5 µM Cytosin-β-D-Arabinofuranosid (Ara-C) dem Nährmedium zugesetzt.

In einzelnen Versuchen wurde neben der Beschichtung der Deckgläser mit Matri-Gel auch die Applikation von Matri-Gel als Mediumzusatz durchgeführt. Dazu wurden 75 µg frisch aufgetautes Matri-Gel pro ml Medium in der Kälte im Nährmedium gelöst, anschließend auf 37^0C erwärmt und direkt eingesetzt. Matri-Gel als Mediumzusatz wurde in diesen Versuchen beim ersten und bei jedem zweiten Mediumwechsel angewendet.

3.3.6. Vitalitätstest an primärkultivierten Neuronen

(Petroski und Geller, 1994)

Als Vitalitätsmarker wurden dem Medium der zu untersuchenden Primärkultur 10 µM 5(6)-**C**arboxy**f**luoresceine**d**i**a**cetat (CFDA, Fa. Sigma) zugesetzt und die Kulturen für 15 min bei 37^0C weiter kultiviert. CFDA ist ein membranpermeables und nicht

fluoreszierendes Molekül. In vitalen Neuronen wird das Molekül durch zytosolische Esterasen in das fluoreszierende Anion 5(6)-**C**arboxy**f**luorescein (CF) hydrolysiert. Die Primärkulturen wurden anschließend zweimal für 20 min bei 37^0C mit HBSS-Puffer gewaschen. Dabei wurde das nicht membranpermeable und fluoreszierende CF aus den Gliazellen gewaschen, während es in Neuronen nach wie vor nachweisbar war. Der Fluoreszenznachweis wurde entweder in fixierten Zellen (siehe 3.5.1.) oder *in vivo* durch Fluoreszenzmikroskopie (siehe 3.6.) durchgeführt.

3.4. Proteinexpression

3.4.1. Transfektion von Expressionsvektoren

3.4.1.1. Kalziumphosohat-Methode

(Chen und Okayama, 1987)

Bei der Transfektion von Gewebekulturen wurden die Zellen einen Tag vorher mit einer Dichte von $1x10^5$ pro Kulturschale (d = 35 mm, Fläche: 8,8 cm^2, 2 ml Medium) ausgesät und über Nacht kultiviert. Direkt vor der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 2 ml frischem Nährmedium versorgt und bis zur Applikation der Transfektionslösung im Brutschrank bei 37^0C inkubiert.
Neuronenkulturen wurden direkt mit der Transfektionslösung versetzt.
Zur Herstellung der Transfektionlösung wurden in einem Reaktionsgefäß 3 µg Plasmid-DNA (Expressionsvektor) in 75 µl einer 250 mM $CaCl_2$-Lösung gelöst. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 75 µl 2xBBS-Puffer (pH 6,95 bei 20^0C) vorgelegt und anschließend die DNA-Lösung tropfenweise zupipettiert. Nachdem die Transfektionslösung gut durchmischt worden war, wurde sie für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Durch Schwenken der Kulturschale wurde die Transfektionslösung im Medium verteilt. Nach einer Inkubation von mindestens 3 h bei 3% CO_2, 37^0C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen bis zur Weiterverarbeitung normal kultiviert.
Bei der Transfektion von Neuronen wurde in einigen Versuchen die Inkubation bei 3% CO_2 vernachlässigt. An Neuronenkulturen wurden auch Doppeltransfektionen getestet. Dabei wurde 24 h nach der ersten Transfektion eine zweite durchgeführt.

In Doppeltansfektionsexperimenten wurde die Transfektionslösung aus Plasmid-DNA unterschiedlicher Expressionvektoren hergestellt.

3.4.1.2. Transfektion mit kationischen Lipid-Reagentien

Die Transfektion von Expressionsvektoren in eukaryonte Gewebezellen und primär kultivierte Neuronen unter Verwendung von kationischen Lipiden wurde mit den käuflichen Reagentien DOTAP (Stamatatos et al., 1988; Fa. Boehringer Mannheim; 1 mg/ml; 20-35 µg pro Transfektion), LIPOFECTIN (Malone et al., 1989; Fa. LifeTechnologies; 15-25 µl pro Transfektion) und DMRIE-C (Felgner et al., 1994; Fa. LifeTechnologies; 2 mg/ml; 6-10 µg pro Transfektion) durchgeführt.

Bei der Transfektion von Gewebekulturen wurden die Zellen einen Tag vorher mit einer Dichte von $1x10^5$ pro Kulturschale (d = 35 mm) ausgesät und über Nacht kultiviert. Direkt vor der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 2 ml OPTI-MEM I versorgt und bis zur Applikation der Transfektionslösung im Brutschrank bei 37^0C inkubiert.

Neuronenkulturen wurden entweder direkt mit der Transfektionslösung versetzt oder die Hälfte des alten Nährmediums vor der Transfektion gegen OPTI-MEM I ausgetauscht.

Im Folgenden wird die Transfektion mit DMRIE-C beschrieben, da es die höchsten Transfektionsausbeuten erzeugte. Prinzipiell unterscheiden sich die einzelnen Arbeitsschritte bei der Transfektion mit den verschiedenen kationischen Lipid-Reagentien aber nicht voneinander.

Zur Herstellung der Transfektionslösung wurden in einem ersten Reaktionsgefäß 2,5-4,5 µg Plasmid-DNA und in 500 µl OPTI-MEM I verdünnt und durchmischt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 500 µl OPTI-MEM I und 3,2-4,5 µl kationische Lipid-Lösung gemischt. Die optimalen DNA- und Lipid-Mengen variierten in Abhängigkeit zum Zelltyp und Expressionsvektor. Tropfenweise wurde die DNA-Lösung der Lipid-Lösung zugeführt. Die Transfektionslösung wurde durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gut durchmischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Transfektion wurde das OPTI-MEM I auf den Zellen abgesogen und die Transfektionslösung tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Nach einer Transfektionszeit von 3,5-5 h bei 5% CO_2, 37^0C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit wurde die Transfektionlösung durch 2 ml Nährmedium ersetzt und die Zellen unter normalen Bedingungen kultiviert.

Bei der Transfektion von Neuronenkulturen wurde darauf geachtet, daß stets ein Restvolumen von etwa 500 µl Medium die Zellen bedeckte. Hier wurde maximal 2 h mit der Transfektionslösung inkubiert.

3.4.2. Mikroinjektion von Expressionsvektoren und cRNA

(Ikeda et al., 1992)

Einen Tag vor der Mikroinjektion wurden CELLocates für 15 min bei Raumtemperatur mit Poly-L-Lysin behandelt (siehe 3.3.2.3.) und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Gewebekulturzellen wurden mit einer Dichte von 0,5-1x10^4 Zellen pro CELLocate ausgesät und bis zur Mikroinjektion unter normalen Bedingungen kultiviert.
SCG-Neurone wurden direkt injiziert.
Die zu injizierende Plasmid-DNA (Expressionsvektor) wurde in steril filtriertem H_2O auf eine Konzentration von 50-500 ng/µl (entsprechend den Versuchsbedingungen) verdünnt und für 30 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (EppendorfTischzentrifuge, 14000 UpM). Bei der Mikroinjektion von transkribierter cRNA wurde diese in sterilem H_2O (siehe 3.1.20.) auf eine Konzentration von 30-50 ng/µl verdünnt und für 30 min bei 4^0C zentrifugiert.
Von der DNA- oder cRNA-Lösung wurden 1,5 µl in den Schaft einer Mikroinjektionsnadel (Femtotips, Fa. Eppendorf) pipettiert und diese nach Abstreifen der Schutzhaube in den Injektionsstand (Mikroinjektor 5242, Fa.Eppendorf; Automatisches Injektionssystem, Fa. Zeiss) eingespannt. Die Mikroinjektion wurde bei einem Injektionsdruck von 40-100 hPa, einem Haltedruck von 45-120 hPa und einer Injektionszeit von 2-4 ms, bei einer Verzögerung von 0,2-0,4 ms automatisch injiziert. Die Mikroinjektionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der Mikroinjektion wurden die Zellen unter normalen Bedingungen kultiviert.

3.4.3. Infektion mit Semliki Forest Virus

(Berglund et al., 1993)

Die Infektion mit Semliki Forest Virus (SFV) wurde mit rekombinantem Viren durchgeführt. Durch Verwendung der Expressionsvektoren pSFV-1 und pSFV-helper2 (Vektorkarten im Anhang) waren die rekombinant hergestellten Viren nicht in der Lage von selbst eukaryonte Zellen zu infizieren (siehe 4.7.3.1.) bzw. nach ihrer Aktivierung (siehe 3.4.3.2.) mehr als einen Infektionszyklus zu durchlaufen. Die durchgeführten Versuche unterlagen somit der Laborsicherheitsstufe S1 und waren von einer Umgangsgenehmigung für die Handhabung von Viren befreit (Robert-Koch-Institut, 1996).
Der Expressionsvektor pSFV-helper2 wurde freundlicherweise von Dr. Mark Marsh (MRC Laboratory für Molecular Cell Biology; University College London; England) zur Verfügung gestellt.

3.4.3.1. Herstellung inaktiver rekombinater Viren

Von den Expressionsvektoren pSFV-1 (enthielt die zu exprimierende cDNA) und pSFV-helper2 wurden durch *in vitro* RNA-Transkription (siehe 3.1.20.) mit Hilfe der SP6-RNA-Polymerase die cRNAs synthetisiert. Vor der RNA-Synthese wurde dem Reaktionsansatz zusätzlich 1 µl 20 mM GTP-Lösung zugefügt und die Synthesezeit auf 2 h verlängert. In einer Doppeltransfektion (siehe 3.4.1.) wurden 2,0 µg pSFV-helper2-cRNA und 2,5 µg pSFV-1-cRNA mit Hilfe von 4,5 µl DMRIE-C in COS-7 Zellen transformiert. Bei der Herstellung der Transfektionslösung wurde die kationische Lipid-Lösung in 1 ml OPTI-MEM I vorgelegt und die cRNAs direkt in diese Vorlage pipettiert. Die Transfektionslösung wurde ohne weitere Inkubationszeit direkt auf die Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1,5-2 h wurde die Transfektionslösung durch 2 ml Nährmedium ersetzt und die Zellen für 24-36 h unter normalen Bedingungen kultiviert. Am Ende wurde der Mediumüberstand, der die inaktiven, rekombinanten Viren enthielt, gesammelt und für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Minifuge, 2000 UpM, Fa. Haereus). Der Überstand mit dem Virus wurde bei 4^0C gelagert.

3.4.3.2. Aktivierung der rekombinanten Viren

Von der Viruslösung wurden 100-400 µl (in Abhängigkeit zum Virustiter und dem Alter der Viruslösung) mit 6 µl Chymotrypsin-Lösung (2% (w/v) in OPTI-MEM I) versetzt, durchmischt und für 10 min bei 37^0C inkubiert. Nach der Chymotrysinbehandlung wurden 6 µl Aprotinin (1% (w/v) in OPTI-MEM I; Fa. Boehringer) dazupipettiert, durchmischt und weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

3.4.3.3. Infektion

Von den zu infizierenden Zellen wurde die Hälfte des Mediums verworfen und die Lösung mit dem aktivierten Virus auf die Zellen pipettiert. Nach einer Inkubation von 1,5 h unter normalen Kultivierungsbedingungen wurde die Viruslösung gegen Nährmedium ausgetauscht. Die infizierten Zellen wurden unter normalen Bedingungen 3-18 h kultiviert. Die Proteinsynthese wurde in einigen Versuchen durch Applikation von Cycloheximid (50 µg/ml Medium) vorzeitig gestoppt.

3.4.3.4. Bestimmung des Virustiters

Durch Verwendung der in den Expressionsvektor pSFV-1 klonierten cDNA für das selbstfluoreszierende Protein EGFP (**e**nhanced **g**reen **f**luorescent **p**rotein, pSFV-EGFP) wurde die Proteinexpression kontrolliert. Bei einer jeden Virus-Synthese wurde parallel in einer Kontrollreaktion eine Viruslösung von EGFP enthaltenden Viren (SFV-EGFP) hergestellt. Durch Infektion von zweidimensional konfluenten COS-7 Kulturen mit unterschiedlichen Verdünnungen an SFV-EGFP und Auszählen der positiv infizierten (fluoreszierenden) Zellen nach einer Infektionszeit von 18 h, wurde der Titer dieser Virenlösung bestimmt. Für die parallel hergestellten Viruslösungen wurde ein Titer der gleichen Potenz angenommen.

3.5. Immunhistochemie

(Coligan et al., 1991)

Für immunhistochemische Arbeiten wurden die transformierten Gewebekulturzellen 18 h nach der Transfektion umgesetzt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin (0,25% (w/v) pro ml Kultur) behandelt (5 min bei 37°C), mit Nährmedium versetzt und suspendiert. Deckgläser (d = 12 mm) wurden für 15 min bei Raumtemperatur mit Poly-L-Lysin-Lösung (50 µg/ml, steril filtriert) behandelt, anschließend zweimal mit PBS gespült und kurz getrocknet. Auf diese beschichteten Deckgläser wurden die transfizierte Zellen mit einer Verdünnung von 1:20 bis 1:40 ausgesät. Die Zellen wurden je nach Versuchsplanung unter normalen Bedingungen weitere 18 bis 36 h kultiviert.
Transfizierte oder infizierte Neuronen wurden direkt fixiert (siehe 3.5.1.). Bei der Immunhistochemie von Neuronen wurden dem PBS, außer bei der Behandlung mit sekundärem Antikörper, in der Regel 0,1-0,3% (v/v) Triton X-100 zugesetzt.

3.5.1. Fixierung der Zellen

Das Nährmedium wurde abgesaugt und die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur (oder 37°C) mit p-Formaldehyd (4% (w/v) in PBS) behandelt. Die fixierten Zellen wurden dreimal für 5 min bei Raumtemperatur (oder 37°C) mit PBS gewaschen. In einigen Versuchen waren die Zellen für mindestens 30 min bei Raumtemperatur (oder 37°C) mit Blocklösung inkubiert worden, bevor der primäre Antikörper auf die Zellen gegeben wurde.

3.5.2. Antikörperinkubationen

Der primäre Antikörper würde in Blocklösung entsprechend verdünnt und auf die Zellen gegeben. Die primäre Antikörperinkubation wurde für 1-2 h bei 37°C oder alternativ bei 4°C über Nacht durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen wieder dreimal für 5 min bei Raumtemperatur (oder 37°C) mit gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde in der Regel ein mit fluoreszierenden Molekülen (FITC, Cy3, Cy2) konjugierter verwendet, der in PBS entsprechend verdünnt wurde. Die Zellen wurden damit bei Raumtemperatur für

1 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, ebenfalls im Dunkeln, fünfmal für 3 min bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen und anschließend mit der Oberfläche auf einen Objektträger gelegt. Durch Verwendung von Eindeck-Medium (Aqua-Poly/Mount, Fa. Polyscience), das vorher auf die Objektträger pipettiert worden war, wurden die Zellen Luftdicht abgeschlossen. Die fixierten und immunhistochemisch behandelten Zellen wurden bis zur mikroskopischen Analyse bei 4°C im Dunkeln gelagert.

3.6. Fluoreszenzmikroskopie

Bei der mikroskopischen Analyse wurden die immunhistochemisch behandelten Zellen mit UV-Licht bestrahlt, wodurch die an den sekundären Antikörper konjugierten Fluorochrome (FITC, Cy2 oder Cy3; alle Fa. Amersham) zur Fluoreszenz angeregt wurden. Durch Verwendung spezieller Anregungs- und Sperrfilter sowie entsprechend geeigneter Fluoreszenzobjektive wurden die immunologisch spezifisch markierten Proteine innerhalb der Zellen nachgewiesen.
Bei dem Nachweis von EGFP oder von mit EGFP markierten Proteinen (siehe 4.2.) wurden die gleichen Filtersätze wie beim FITC (Anregungsfilter BP450/490, Sperrfilter LP520; Fa. Zeiss) verwendet. Der Nachweis der EGFP-Fluoreszenz *in vivo* wurde an einem Axioskop (Fa. Zeiss) in 400facher Vergrößerung (Achroplan 40x Wasserimmersionsobjektiv, Phase 2, 10x Okulare, Fa. Zeiss) oder aber in speziellen Zellkulturschalen (*Der Boden der Kulturschale war mit einem Loch versehen worden, in das von außen ein Deckglas geklebt werden war, auf dem die Zellen kultiviert wurden*) am konfokalen Rasterlasermikroskop durchgeführt.

3.6.1. Konfokale Rasterlasermikroskopie

Alle Bilder wurden mit einem konfokalen Rasterlasermikroskop (interne TCS NT Laser: Argon (Emission bei 488nm) und Krypton (Emission bei 568 nm), inverses Mikroskop: DM IRBE, Fa. Leica) im „slow scan“-Modus aufgenommen. Durch die computergesteuerte Fokussierung wurden mit nichtinvasiven Methoden optische Schnitte durch das fluoreszenzmarkierte Präparat gelegt. In der Regel wurde eine Zelle durch 8 bis 12 optische Schnitte vollständig durchrastert. Die Zellen wurden mit 200facher (Neofluar

Plan 20x, Phase 1, 10x Okulare, Fa. Leica), 400facher (Plan Apochromat 40x Ölimmersionsobjektiv, Phase 3, 10x Okulare, Fa. Leica) und 630facher (Plan Apochromat 63x Ölimmersionsobjektiv, ohne Phasenkontrast, 10x Okulare, Fa. Leica) Vergrößerung aufgenommen und die Aufnahmen digitalisiert. Bei Doppelmarkierungen wurde im Mehrkanalmodus mit verschiedenen Filtersätzen (Cy3: Anregungsfilter BP530/600, Sperrfilter LP580, FITC und Cy2: Anregungsfilter BP515, Sperrfilter LP 515) gleichzeitig gearbeitet, dabei war ein jeder Filter so eingestellt worden, daß eine Überstrahlung und damit ein falschpositives Signal im benachbarten Fluoreszenkanal vermieden wurde. Die Aufnahmen der einzelnen Schnitte und Kanäle wurden mit Hilfe der auf das Mikroskop abgestimmten Bildbearbeitungssoftware (Leica TCS NT, Version 1.6.551, Fa. Leica) ausgewertet. Die so erzeugten dreidimensionalen Bilder wurden mit den Programmen Adobe Photoshop (V 4.0; Fa. Adobe Systems) und Freehand (V 7.0; Fa. Macromedia) bis zum Druck weiterverarbeitet.

3.7. Elektrophysiologie

Durch Standard Patch-Clamp Aufnahmen in der whole-cell Konfiguration wurden makroskopische Ströme gemessen. Die Messungen wurden an CHO-Zellen 48 bis 62 h nach Transfektion mit dem entsprechenden Expressionsvektor durchgeführt. Die Zusammensetzung der Bad-Lösung sowie der Pipetten-Lösung ist der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Bad-Lösung	***Konzentration in mM***	**Pipetten-Lösung:**	***Konzentration in mM***
NaCl	135	K-Aspartat	95
KCl	5	KCl	20
$CaCl_2$	2	$CaCl_2$	1
HEPES	5	HEPES	10
Glucose	10	EGTA	11
Sucrose	20	Glutathion	2
mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt		mit KOH auf pH 7,2 eingestellt	

Für die Konzentration an freien Ca^{2+}-Ionen wurden 20 nM berechnet (EQCAL, Fa. Biosoft Camebridge). Die Patchpipetten wurden aus Borosilikatglas, das einen Widerstand von 2-4 MΩ hatte, gezogen. Es wurden nur Experimente berücksichtigt, die einen seriellen

Widerstandswert kleiner als 10 MΩ aufwiesen, wobei eine Kompensation des seriellen Widerstandes (0-80%) durchgeführt wurde, um einen Spannungsfehler von weniger als 5 mV zu erhalten. Die Ströme wurden mit einem EPC9-Verstärker (Fa. HEKA Elektronik) aufgenommen. Das Softwarepaket PULSE + PULSEFIT (Fa. HEKA Elektronik) wurde zur Datenaufnahme und -auswertung angewendet. Leck- und kapazitive Ströme wurden online mit der P/4-Methode subtrahiert, dabei wurden P/4-Pulse 2 s nach dem Testpuls und Interpulse in 30 s Intervallen (bei Kv4.2 in 20 s) verabreicht. Die Aufnahmen wurden mit 5 kHz digitalisiert und mit 1 kHz Bessel gefiltert. Zur Quantifizierung der Zeitkonstanten der Kaliumströme wurden die einzelnen Stromspuren mit einem Hodgkin-Huxley verwandten Formalismus gefittet:

$I = I^0 m(t)^4 h(t)$; mit $m(t) = 1 - \exp(-t/t_m)$ und $h(t) = h_u + a_1 a_2 \exp(-t/t_{h1}) + (1 - a_1 a_2) \exp(-t/t_{h2})$

Die Zeitkonstanten t_m, t_{h1} und t_{h2} bestimmen die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik. Der steady-state Strom wird durch h_u definiert. Die relativen Anteile der zwei Inaktivierungskomponenten (h_1/h_2) wurden durch die Variablen a_1/a_2 bestimmt. Alle Experimente wurden bei 20^0C durchgeführt.

3.8. Computergestützte Sequenzanalysen

Computergestützte Analysen von DNA- und Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des GCG-Programmpakets (Wisconsin Package, Fa. Genetic Computer Group, Version 9, www.gcg.com), Datenbankrecherchen am Medline-, BLASTN- und BLASTP-Server des NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt.

4. Ergebnisse

Der gerichtete Proteintransport der kinetisch einander verwandten A-Typ Kanäle Kv1.4 und Kv4.2 führt in gleichen Neuronentypen des Hippocampus zur axonalen Lokalisation des Kv 1.4 α-Proteins und zur somatodendritischen Orientierung des Kv4.2 α-Proteins (siehe 1.2.). Aufgrund der im membrandurchspannenden Bereich weitesgehend homologen Struktur der beiden α-Proteine werden die transportbestimmenden Signale oder Motive in den zytoplasmatisch orientierten Bereichen der Proteine vermutet. Transportstudien des Kv1.4 α-Proteins im MDCK-Zellmodell deuten darauf hin, daß die Transport-determinanten im carboxyterminalen zytoplasmatisch orientierten Proteinbereich liegen (siehe 1.3.). Diese Aspekte wurden bei der Konstruktion spezifischer α-Untereinheiten zu Grunde gelegt. Dabei wurde berücksichtigt, daß bei der Entwicklung eines neuronalen Expressionssystems die spezifischen α-Untereinheiten nach einer heterologen Gen-expression im Neuron vor dem Hintergrund von potentiell endogen vorkommenden Kv-Proteinen spezifisch nachweisbar waren.

4.1. Klonierung der Kv4.2 α-Untereinheit

Zu Beginn der Arbeit stand eine nur unvollständige cDNA der Kv4.2 α-Untereinheit zur Verfügung. Diese cDNA entsprach der von Roberds et al. (1991; Acc.: M59980) veröffentlichten cDNA-Sequenz für die Kv4.2 α-Untereinheit, die jedoch, vermutlich aufgrund eines Sequenzierfehlers, im 3‘-Bereich eine Deletion von zwei Basen aufwies und durch die dadurch entstandene Verschiebung des Leserahmens zu einem vorzeitigen Transkriptionsabbruch führt (Abbildung 1).
Unter Verwendung der korrigierten cDNA-Sequenz (Baldwin et al.; 1991; Acc.: S64320) wurden Oligonukleotidprimer abgeleitet (Abbildung 2) und eine cDNA Bank aus dem Hippocampus einer Ratte (Fa. Stratagene) mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (siehe 3.1.1.) nach dem 3‘-Bereich durchmustert.

Abbildung 1: **Verschiebung der cDNA-Sequenzen und daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen:**

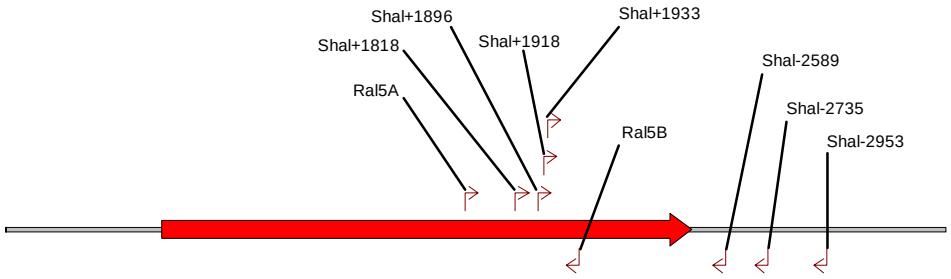
```
cDNA-Sequenz nach
Roberds 1598    ...caactgcagtcctcggaggatgaaccggccttcgttagcaaatctggatcc 1648
und             ...||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Baldwin 1917    ...caactgcagtcctcggaggatgaaccggccttcgttagcaaatctggatcc 1967
         456    ...Q  L  Q  S  S  E  N  E  P  A  F  V  S  K  S  G  S    473

         474      S  F  E    T  T  P  P  P  A  S  L  P  G  Q  N  H  E     490
Roberds 1649      agcttcgag..acaacaccaccacctgcttcactgcctggagaaaaccacg... 1697
und               |||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Baldwin 1968      agcttcgagacacaacaccaccacctgcttcactgcctggagaaaaccacg... 2018
          474     S  F  E  T  Q  H  H  H  L  L  H  C  L  E  K  T  T  ...  490
PCR-Frgmt.        ~~~~~~~~~~~~~~~g~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

         491        P  *(STOP)              Nukleotide sind in kleinen und
Roberds 1698      aaccatgagtttgtg... 1712   Aminosäuren in großen Buchstaben
und               |||||||||||||||          dargestellt.
Baldwin 2019      aaccatgagtttgtg... 2033   Homologe Nukleotide im PCR-Frgmt.
         491      N  H  E  F  V  ...  495   werden mit ~ gekennszeichnet.
```

Die gewünschten DNA-Fragmente mit einer kalkulierten Größe zwischen 817 bp und 1135 bp (je nach Primerkombination, siehe Abbildung 2) wurden weder durch Reamplifikation mit „inneren“ Primern („nested PCR“), noch durch Variation der Temperatur, des PCR-Protokolls („hot start“, „touch-down“) oder der DNA-Polymerase synthetisiert. Erst nach Verlängerung der Synthesedauer auf 1,5-2 min wurden größere DNA-Fragmente (1,4 kb bis 1,6 kb) synthetisiert, die durch Southern-Blot-Analyse (siehe 3.1.6.) mit einer spezifischen, radioaktiv markierten Sonde (DNA-Fragment zwischen den Primern Ral5A und Ral5B) als positiv nachgewiesen wurden.

Abbildung 2: **Lokalisation der Primer:**



Kv4.2 cDNA; Acc# S64320

Offener Leserahmen: #550 - #2444; Gesamtlänge des cDNA-Klons: 3350 bp

Die PCR-Produkte wurden in einen TA-Vektor (Fa. Invitrogen, Vektorkarte pCRII im Anhang) kloniert und von beiden Seiten ansequenziert. Dadurch wurde auch der Ort des Einschubs von etwa 500 bp in den PCR-Produkten definiert (Abbildung 3). An der Position 2569 (im nicht translatierten Bereich, Baldwin et al., 1991) kommt es nicht nur zum Einschub einer bisher nicht bekannten Sequenz sondern gleichzeitig auch zur Deletion von 4 bp, wodurch die im cDNA-Klon nur einmal vorkommende Not I-Restriktionsschnittstelle zerstört wird. Ob dieser Einschub die Folge eines alternativen Splicevorgangs ist, läßt sich anhand der Sequenz nicht beurteilen, da keine signifikante Homologie zu den bekannten Konsensussequenzen besteht.

Abbildung 3: **Einschub im PCR-Fragment**

```
                                 Einschub etwa 500 bp
PCR-Frgmt    ..gcaagaaggttggcgg atgaga.....attttcttt cgtatccatagat
               ||||||||||||||||                     ||||||||||||
Baldwin      ..gcaagaaggttggcgg ccgc                cgtatccatagat..
          2550                Not I-Schnittstelle ist            2581
                              durch den Einschub zerstört
```

Im translatierten Bereich des isolierten cDNA-Fragmentes wurden im Vergleich zur Nukleotidsequenz von Baldwin et al. (1991) drei Punktmutationen gefunden, die durch mehrere unabhängig durchgeführte PCR-Reaktionen bestätigt wurden. Während es sich bei der ersten Mutation an der Position 1982 (a → g) um eine stille Mutation handelte, die also keine Veränderung der abgeleiteten Aminosäuresequenz zur Folge hatte (siehe Sequenz des PCR-Fragmentes in Abbildung 1), führte die zweite Mutation an der Position 2160 (t → a) zu einer konservierten Veränderung der Aminosäuresequenz (Serin → Threonin). Die Sequenz von Roberds et al. (1991) weist an dieser Stelle ebenfalls ein a auf. Die dritte Mutation wurde an der Position 2308 (t → c) gefunden und führt in der abgeleiteten Aminosäuresequenz zum Austausch von Leucin nach Prolin (Abbildung 4).

Abbildung 4: **Punktmutationen der PCR-Fragmente:**

Mutation an Postition 2160:

```
Roberds 1830   ...cacaaaaaaactttccga... 1847
und               |||||||| ||||||||
Baldwin 2151   ...cacaaaaaatctttccga... 2168
        534    ...H  K  K  S  F  R  ...  539
PCR-Frgmt.     ...~~~~~~~~~a~~~~~~~~
               ...H  K  K  T  F  R  ...
```

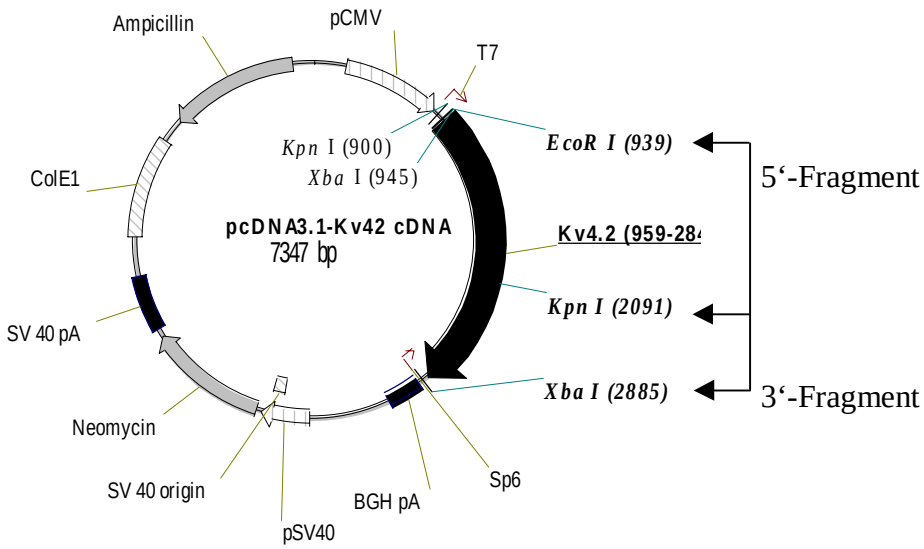
Mutation an Postition 2308:

```
1977 ...tgtgtcaaactaaactgt... 1994
          ||||||||||||||||||
2298 ...tgtgtcaaactaaactgt... 2315
 583 ...C  V  K  L  N  C  ...  588
     ...~~~~~~~~~~c~~~~~~~
     ...C  V  K  P  N  C  ...
```

Die Amplifikation des entsprechenden DNA-Fragments aus genomischer Ratten-DNA verlief erfolglos. Es ist deshalb anzunehmen, daß auf genomischer Ebene dieser Teil des kodierenden Bereiches auf verschiedenen Exonen lokalisiert ist.

Mit dem isolierten DNA-Fragment wurde die unvollständige Kv4.2-cDNA korrigiert bzw. vervollständigt. Dabei wurde durch die Methode der *in vitro* Mutagenese (siehe 3.1.19 und 3.1.20.) eine Xba I-Restriktionsschnittstelle (siehe 2.3. Oligonukleotid: Shal-2589) hinter dem Stopcodon eingefügt. Unter Verwendung der innerhalb der universellen Klonierungsstelle schneidenden Restriktionsendonukleasen EcoR I und Xba I wurde die Kv4.2 cDNA durch Ligation von drei Fragmenten ((EcoR I/Xba I)-Vektor-, (EcoR I/Kpn I)-Kv4.2- und (Kpn I/Xba I)-Kv4.2-Fragment im Expressionsvektor pcDNA3.1 rekonstituiert (Abbildung 5, Vektorkarte pcDNA3.1 siehe Anhang).

Abbildung 5: **Klonierungsschema Kv4.2 in pcDNA3.1**



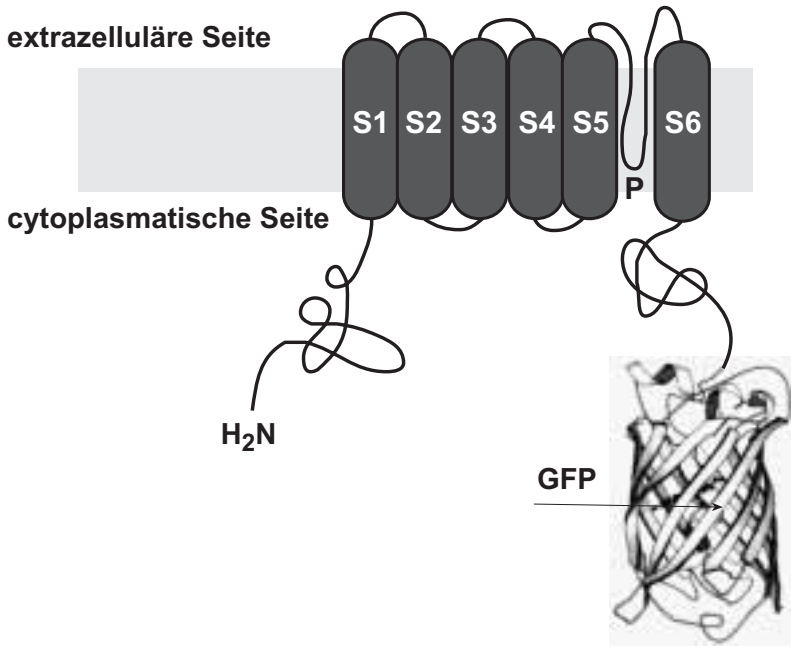
4.2. Markierung der Kv-Kanäle mit EGFP

Der Nachweis von heterolog exprimierten Proteinen kann auf indirektem Wege durch die Methode der Immunhistochemie (siehe 3.5.) oder direkt aufgrund einer spezifischen Markierung erfolgen. Unter Verwendung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) besteht die Möglichkeit einer solchen direkten Proteinmarkierung (Chalfie et al., 1994).

Die Markierung des Kv1.4 und Kv4.2 wurde am carboxyterminalen Ende der α-Untereinheiten durchgeführt, so daß das GFP im zytoplasmatischen Bereich der Fusionsproteine

lokalisiert ist (Abbildung 6). Dabei wurde durch die Wahl der Oligonukleotidprimer die Sequenz des GFP (Acc.: M62654; Prasher et al., 1992) im Leserahmen direkt vor dem Stopcodon der α-Untereinheiten eingeführt (Klonierungsprinzip siehe am Beispiel der EGFP-Varianten weiter unten).

Abbildung 6: **Markierung der Kv-Kanäle mit GFP**

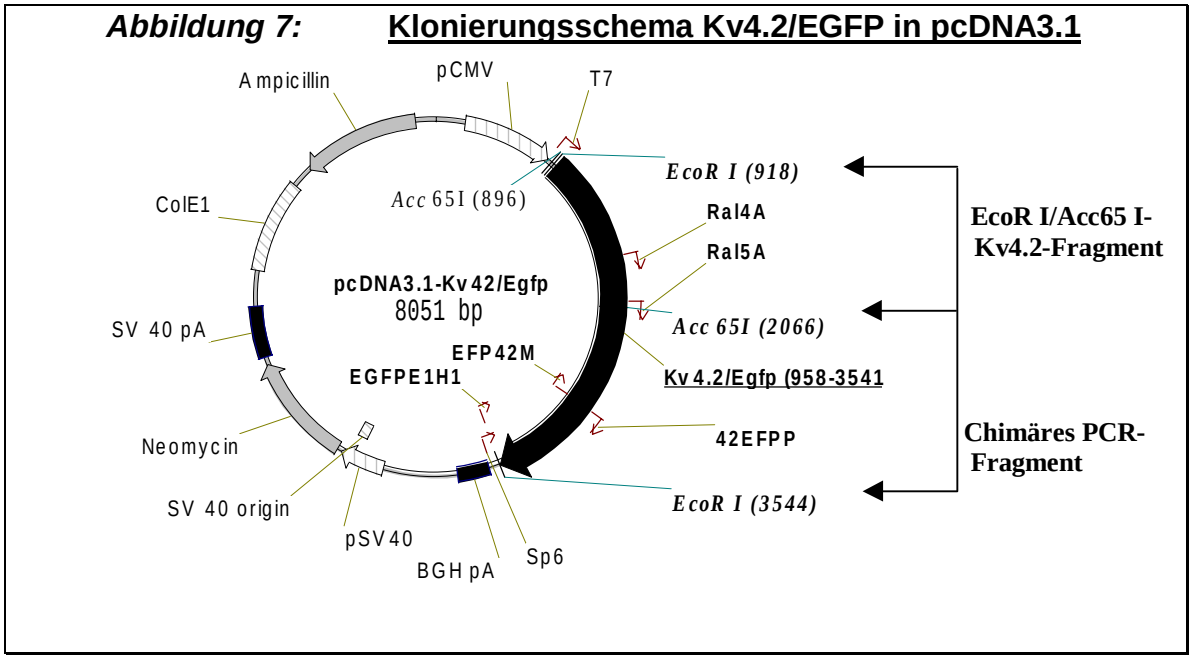


Nach der Markteinführung des GFP durch Clontech im Jahre 1994 wurden eine Reihe von Proteinvarianten konstruiert, die zur Verbesserung der GFP-Fluoreszenzeigenschaften beitrugen. In chronologischer Abfolge wurden auch die in den Fusionskonstrukten Kv1.4/GFP und Kv4.2/GFP verwendete Sequenz des GFP entsprechend optimiert. Zunächst wurde in den Fusionkonstrukten durch die Methode der gerichteten Mutation (siehe 3.1.18.) das Serin (Aminosäureposition 65) gegen Threonin (S65T) ausgetauscht (*Mutationsprimer P1:* GFP+S65T *und P2:* GFP-S65T, siehe 2.3.), welches der Proteinvariante GFP_{S65T} (Heim et al., 1994) entsprach. Später wurde für die Sequenz des GFP die des EGFP (enhanced green fluorescent protein) verwendet (Acc.: U55761; Cormack et al., 1996). In der Sequenz des EGFP wurde nicht nur ein verbessertes Chromophor (siehe Tabelle), sondern auch eine den Vertebraten angeglichene Codon-Verwendung eingeführt. Dieses sollte auch zu besseren Expressionsausbeuten der Fusionskonstrukte optimieren.

Protein	Mutante	Absorption (nm)	Emission (nm)	Extinktion ($mM^{-1}cm^{-1}$)	Eigenschaften
GFP	Wildtyp	395 475	508 (475 nm)	21 (395nm), 7 (475 nm)	Photoisomerisierung → Abnahme der Extinktion; Chromophorbildung etwa 2 h.
GFP_{S65T}	S65T	488	511	39; → 6fach stärker als GFP	Keine Photoisomerie; Chromophorbildung in etwa 20 min.
EGFP	F64L, S65T	488	507	→35fach stärker als GFP	Wie GFP_{S65T}, Alternative Codon-Verwendung

Bei der Herstellung des rekombinanten Klones Kv4.2/EGFP (siehe 3.1.19.) wurden zunächst die PCR-Produkte Ia (*Template:* pcDNA3.1-Kv4. (Vektorkarte siehe Anhang); *Primer P1*: Ral4A, *chimärer Mutationsprimer M1:* 42EFPM) und Ib (*Template:* pcDNA3.1-EGFP; *Primer P2:* EGFPE1H1; *chimärer Mutationsprimer M2:* EFP42P) synthetisiert. Anschließend wurden in einer dritten PCR die beiden ersten PCR-Produkte aneinandergelagert und unter Verwendung spezifischer Primer (*P1:* Ral5A, *P2:* EGFPE1H1) das chimäre PCR-Produkt II amplifiziert. Dieses wurde dann mit den Restriktionsenzymen Acc65 I und EcoR I verdaut und zusammen mit dem (EcoR I/Acc65 I)-Fragment der Kv4.2 cDNA (Abbildung 7) in einen mit EcoR I linearisierten pcDNA3.1-Expressionsvektor kloniert (pcDNA3.1-Kv4.2/EGFP).

Abbildung 7: **Klonierungsschema Kv4.2/EGFP in pcDNA3.1**

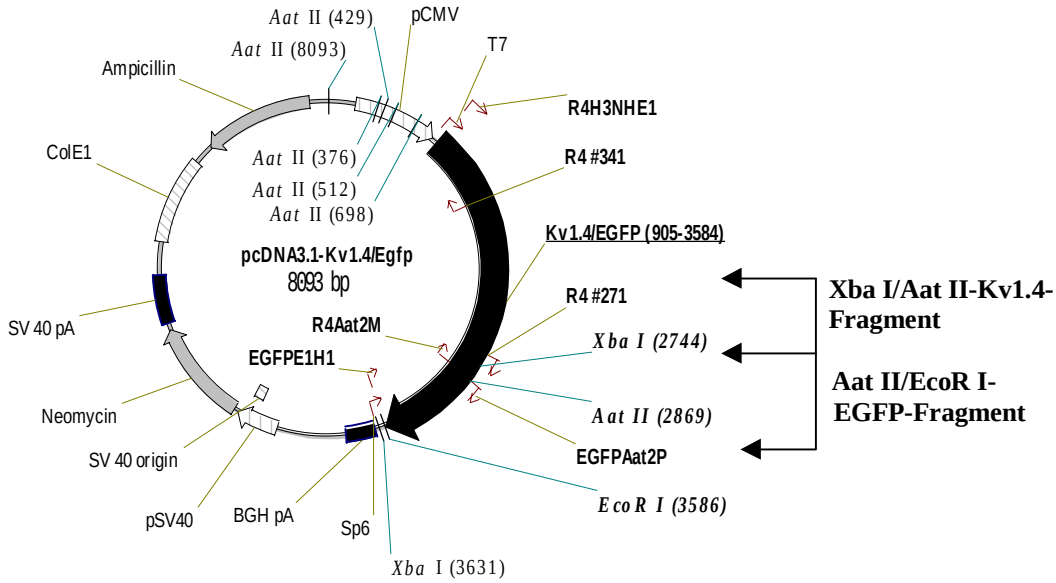


Für die Herstellung des rekombinanten Kv1.4/EGFP-Konstruktes wurde zunächst die cDNA des zur Verfügung gestellten Kv1.4-Klones (pAKS2-RCK4/DraIII, Vektorkarte siehe Anhang) in einen pcDNA3.1-Expressionsvektor kloniert. Dabei wurde mit Hilfe der PCR der in 5'-Richtung liegende nichttranslatierte Bereich, bei gleichzeitigter Einführung einer Kozak-Sequenz (Kozak, 1986) am Startcodon, entfernt (siehe 2.3. Oligonu-

kleotidprimer: R4H3NHE1 und R4 #341). Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und Bpu1102 I verdaut und zusammen mit dem durch Restriktion erhaltenen (Bpu1102 I/Not I)-3'-Fragment aus dem Kv1.4-Klon in ein entsprechend prozessiertes (Hind III/Not I)-pcDNA3.1-Vektorfragment kloniert (pcDNA3.1-Kv1.4, Vektorkarte siehe Anhang).

Anschließend wurde über PCR (*Primer:* R4Aat2M *und* R4 #271 siehe 2.3.) ein Kv1.4-PCR-Fragment synthetisiert, das am Stopdcodon eine neue Aat II-Restriktionsschnittstelle besaß. In einer zweiten PCR (*Template*: pcDNA3.1-EGFP; *chimärer Mutationsprimer M1:* EGFPAat2P; *Primer P2*: EGFPE1H1) wurde ein EGFP-Fragment amplifiziert, in dem das Startcodon deletiert und ebenfalls die zum Kv1.4 komplimentäre Aat II-Restriktionsschnittstelle eingeführt war. Das Kv1.4-PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen Xba I und Aat II verdaut und zusammen mit dem (Aat II/EcoR I)-Restriktionsfragment des EGFP-PCR-Produktes in den mit Xba I und EcoR I restringierten pcDNA3.1-Kv1.4-Vektor kloniert (pcDNA3.1-Kv1.4/EGFP, Abbildung 8).

Abbildung 8: **Klonierungsschema pcDNA3.1-Kv1.4/EGFP**



Im Folgenden werden nur die mit den Kv1.4/EGFP- und Kv4.2/EGFP-Konstrukten erzielten Ergebnisse präsentiert. Alternativ wurde auch ein rekombinantes Kv1.4/Gly/EGFP-Konstrukt entwickelt, in dem die fusionierten Proteine des Kv1.4 und EGFP durch die Sequenz von zwölf Aminosäuren ($(Glycin)_5$-$(Alanin)_2$-$(Glycin)_5$) verbunden waren. Dieses Konstrukt zeigte jedoch bei der Expression in eukaryonten Zellinien kein unterschiedliches Verhalten zum Kv1.4/EGFP-Konstrukt.

4.3. Funktionalität der Konstrukte Kv1.4/EGFP und Kv4.2/EGFP

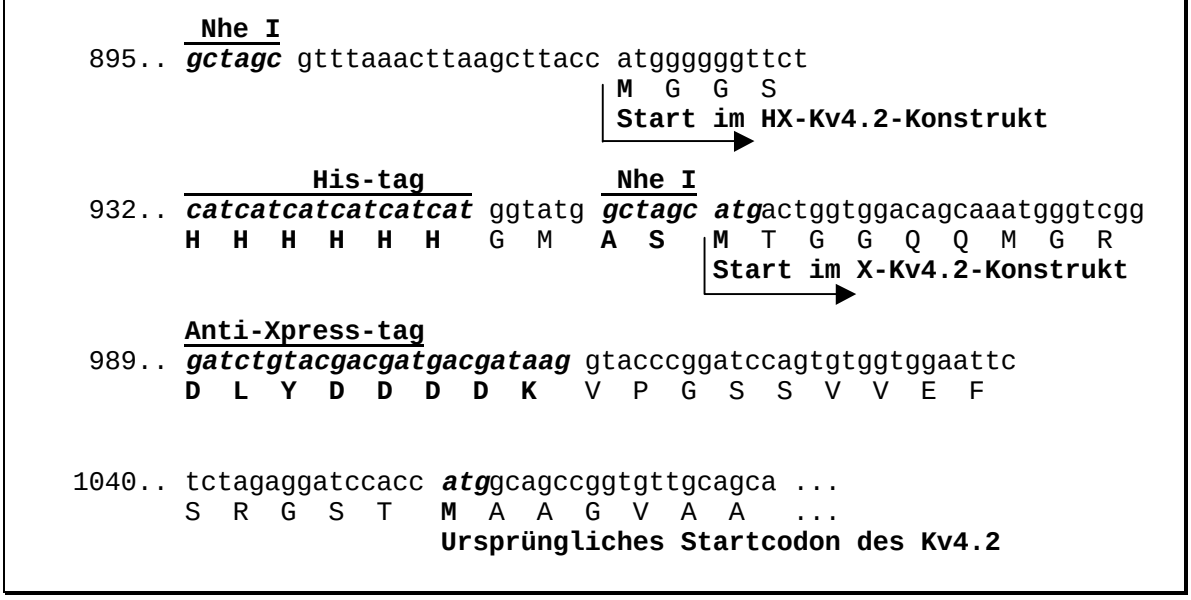
Der Vorteil der angewendeten Klonierungsstrategie, das EGFP an das carboxyterminale Ende der Kv α-Untereinheiten zu fusionieren bestand in dem Erhalt der Funktionalität dieser Konstrukte bezüglich ihres Expressionsverhaltens als Membranproteine und ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften. Beides wurde im Folgenden näher charakterisiert.

4.3.1. Heterologe Genexpression in Gewebekulturzellen

Durch die Methode der chemischen Transfektion unter Verwendung kationischer Lipide (siehe 3.4.1.2.) wurden die verschiedenen pcDNA3.1-Expressionsvektoren in COS-7 Zellen transferiert. Nach einer Inkubationsphase von mindestens 24 h wurden die Zellen fixiert und die heterolog exprimierten Proteine fluoreszenzmikroskopisch (siehe 3.6.) nachgewiesen. In der Regel wurden Transfektionsausbeuten von 20-30% erzielt. Bei der Transfektion nach der Kalziumphosphatmethode (siehe 3.4.1.1.) wurden zwar Transfektionsausbeuten von 40-45% erzielt, jedoch zeigten diese Zellkulturen nach der Transfektion in wesentlich höherem Ausmaße morphologisch deformierte und tote Zellen.
Die Expression der Kv1.4- und Kv4.2 α-Wildtypproteine wurde mit spezifischen Antikörpern immunhistochemisch nachgewiesen. Für den Nachweis der heterolog exprimierten Kv1.4-Wildtypproteine wurde ein polyklonaler Antikörper, der die Aminosäurereste 605-624 im carboxyterminalen Bereich des Kv1.4 α-Proteins erkennt, verwendet (anti-rKv1.4 wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Knaus, Institut für Biochemische Pharmakologie, Innsbruck, Österreich; siehe Roeper et al., 1998). Da für das Kv4.2 α-Protein kein spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, wurde das (EcoR I/Apa I)-Restriktionsfragment der Kv4.2-cDNA aus dem pcDNA3.1-Kv4.2-Vektor (siehe 4.1.) in ein entsprechend prozessiertes (EcoR I/Apa I)-pcDNA3.1/His C-Vektorfragment (Fa. Invitrogen, Vektorkarte siehe Anhang) kloniert. Der resultierende Expressionsvektor, pcDNA3.1-HX-Kv4.2 (Vektorkarte siehe Anhang), kodiert für ein rekombinantes Kv4.2-Protein (weiterhin als HX-Kv4.2-Protein bezeichnet), in dem am aminoterminalen Ende eine zusätzliche Sequenz von 45 Aminosäuren exprimiert ist (Abbildung 9). Innerhalb dieser Sequenz sind die Proteindomänen eines sogenannten „His-tag“ und eines „Xpress-tag“ lokalisiert. Die Proteindomäne des „Xpress-tag“ stellt für sich ein Epitop dar, das von dem monoklonalen anti-Xpress-Antikörper (anti-mXpress,

Fa. Invitrogen) erkannt wird. Durch Verwendung der anti-Xpress-Antikörper wurden die heterolog exprimierten HX-Kv4.2-Proteine dann nachgewiesen. In einem alternativen Konstrukt wurde der „His-tag“ durch Restriktion des pcDNA3.1-HX-Kv4.2 mit Nhe I und anschließender Ligation deletiert (X-Kv4.2-Protein siehe Abbildung 9). Die mit den anti-Xpress-Antikörpern detektierten Expressionsmuster der HX-Kv4.2- und X-Kv4.2-Proteine (ohne Abbildung) zeigten jedoch keinen Unterschied.

Abbildung 9: **Aminoterminaler Proteinbereich des HX-Kv4.2**



Die mit EGFP markierten Proteine (Kv1.4/EGFP und Kv4.2/EGFP) sowie das Wildtyp-EGFP wurden anhand ihrer Autofluoreszenz nachgewiesen.

Bild A zeigt die Verteilung des heterolog exprimierten EGFP. Es ist im gesamten Bereich der COS-7 Zelle lokalisiert mit besonders hoher Dichte im Zellkern. Dieses ist wohl auf die sehr kompakte und einzigartige Struktur („β-can“) des EGFP zurückführen (Ormö et al., 1996; Yang et al., 1996). Eine quantitative Betrachtung der Proteinverteilung anhand der starken Fluoreszenz im Zellkern und der schwächeren und diffusen Fluoreszenz in der Zellperipherie ist nicht möglich. Mit den verwendeten FITC-Filtersätzen (siehe 3.6.1.) war es technisch nicht möglich bei der Aufnahme der einzelnen Zellebenen die Streufluoreszenzen des EGFP aus benachbarten Zellebenen vollständig herauszufiltern. Bei der Erstellung der dreidimensionalen Bilder führte diese Überstrahlung dazu, daß die EGFP-Bilder im Vergleich zu den Cy3-Aufnahmen (rote Fluoreszenzsignale) eine schlechtere Auflösung besitzen. Für das EGFP wurden höhere Fluoreszenzintensitäten beobachtet als für die EGFP-Konstrukte. Dieses liegt vermutlich an der uneingeschränkten

Heterologe Genexpression in COS-7 Zellen:

Bild A: Autofluoreszenz

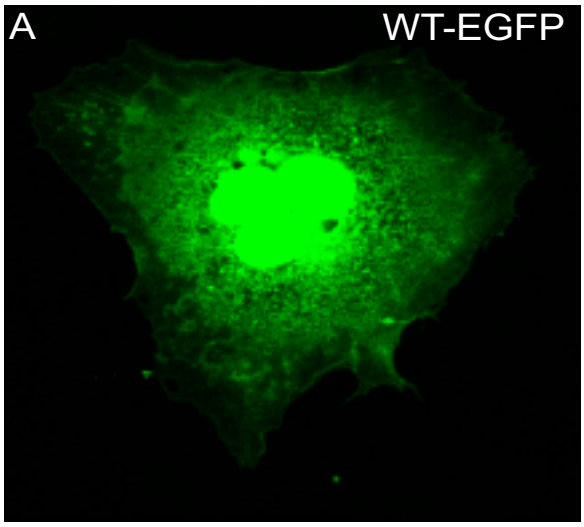


Bild B: Autofluoreszenz

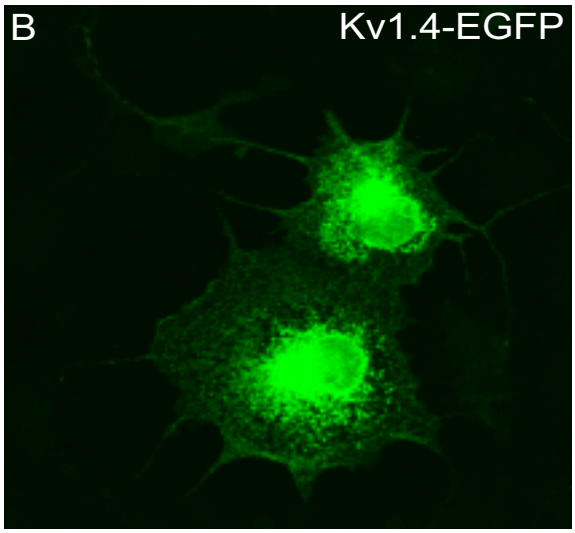


Bild C: anti-rKv1.4 + Autofluoreszenz

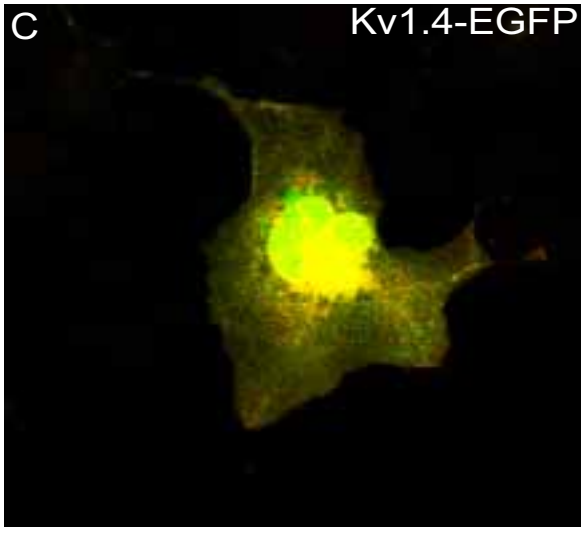


Bild D: anti-rKv1.4

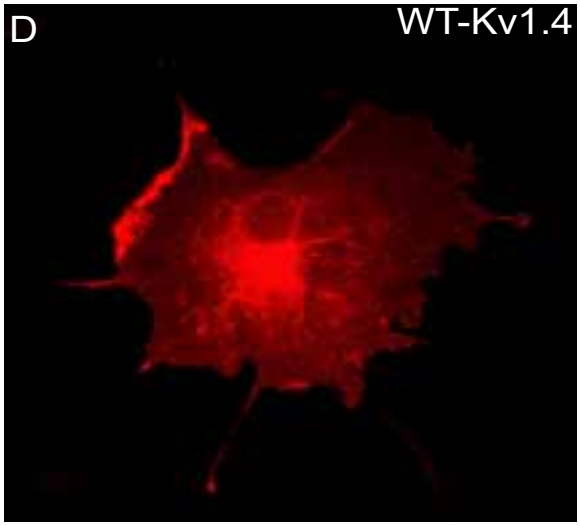


Bild E: anti-mXpress

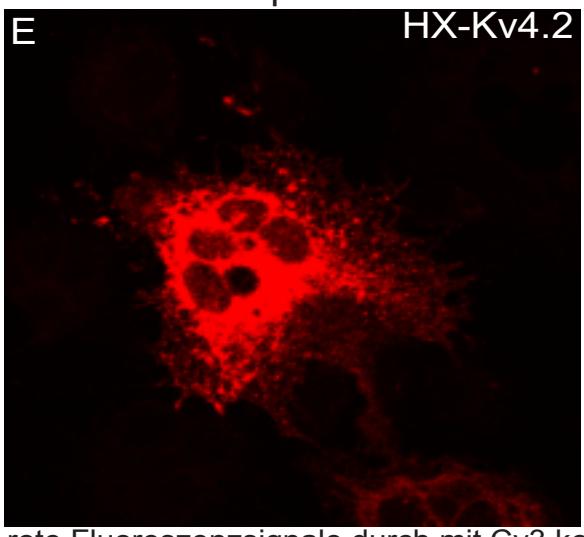
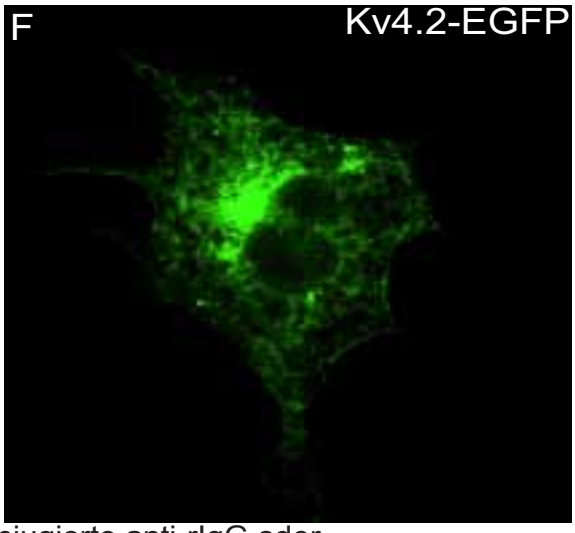


Bild F: Autofluoreszenz



rote Fluoreszenzsignale durch mit Cy3 konjugierte anti-rIgG oder anti-mIgG Zweitantikörper

Möglichkeit zur Ausrichtung des löslichen Proteins innerhalb der Zelle, während die membrangebundenen EGFP-Konstrukte darin eingeschränkt sind.

Die Verteilung des Kv1.4/EGFP ist in Bild B zu sehen. Im Vergleich zu dem löslichen EGFP läßt sich die Lokalisation des Kv1.4/EGFP in den inneren Membranen der Zelle erkennen mit starker Dominanz im Bereich des kernnahen endoplasmatischen Retikulums. Diese läßt sich auf die allmähliche Überladung des endoplasmatischen Retikulums (*ER-overload*) durch heterolog exprimierte Proteine zurückführen. Ursache dafür ist die durch den viralen Promoter (pCMV) regulierte Transkription, die dazu führt, daß die heterologen Proteine im Überschuß produziert werden. Die im Vergleich zum EGFP schwächeren Fluoreszenzsignale im Zellkern resultieren aus der Überstrahlung der EGFP-Fluoreszenz aus den Zellebenen ober- und unterhalb des Kerns und ist nicht als Kernlokalisation zu interpretieren.

In einem Doppelmarkierungsexperiment (Bild C) wurde das Kv1.4/EGFP zusätzlich mit dem spezifischen anti-Kv1.4-Antikörper immunhistochemisch markiert. Die gelben Signale resultieren aus der Überlagerung der grünen EGFP-Fluoreszenz mit der roten Cy3-Fluoreszenz des verwendeten Zweitantikörpers. Da nicht von einer proteolytischen oder enzymatischen Abtrennung des EGFP im Kv1.4/EGFP ausgegangen werden kann, lassen sich die grünen Fluoreszenzsignale nur durch die Überstrahlung der EGFP-Fluoreszenz erklären. Die gelben Signale im Bereich des Zellkerns entstehen durch die dreidimensionale Bildwiedergabe und sind tatsächlich in den Zellschichten ober- und unterhalb des Kerns lokalisiert. Deutlicher ist die feinadrige Verteilung des Kv1.4/EGFP in den inneren Membranen der Zelle zu erkennen sowie die ER-Überladung in Kernnähe.

Bild D zeigt die Verteilung des Kv1.4 α-Proteins. Das resultierende Expressionsmuster ist mit dem des Kv1.4/EGFP (gelbe Signale in Bild C) vergleichbar. Danach hat die Markierung mit EGFP keinen Einfluß auf die Verteilung des Kv1.4 α-Proteins innerhalb der Zelle nach einer heterologen Genexpression. Teilweise werden an den Zellrändern lokale Dichten an Kv1.4 α-Proteinen nachgewiesen. Da die COS-7 Zellen keine Zellpolarität aufweisen, entstehen diese lokalen Dominanzen durch Zellverdickungen, die entweder rein morphologischer Ursache sind oder aber auf den Ort eines Wachstumkegels hinweisen.

Die heterologe Expression des HX-Kv4.2- (Bild E) und des Kv4.2/EGFP-Konstruktes (Bild F) zeigt eine miteinander vergleichbare zelluläre Verteilung der Proteine. Im Vergleich zum Kv1.4 (Bild D) und Kv1.4/EGFP (Bilder D und C) fällt auf, daß die feinadrige Verteilung in den inneren Zellmembranen bei den Kv4.2-Proteinen nicht so

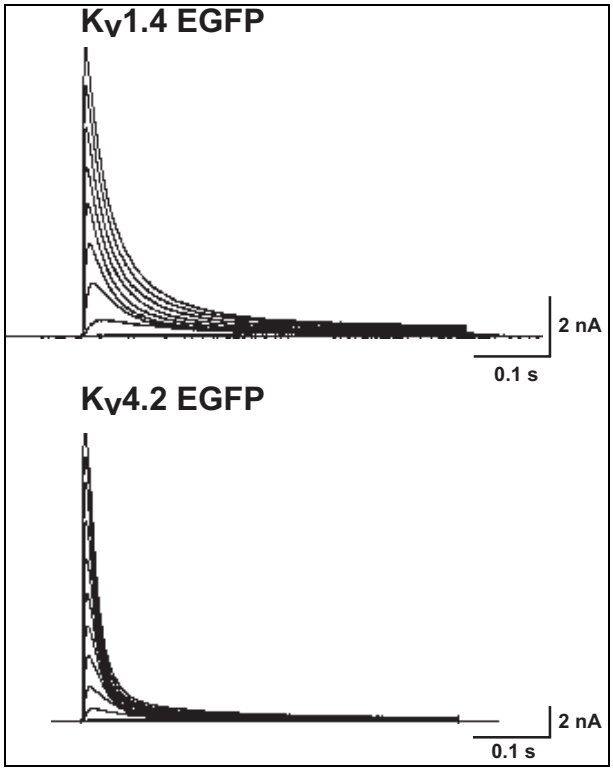
gleichmäßig ist. Teilweise werden im Bereich der inneren Membranen lokal sehr hohe Proteindichten in Form von vesikulären Signalen (siehe Punkte im Bild E) nachgewiesen. Auffällig ist eine stärkere ER-Überladung zu beobachten. Dieses und der Umstand, daß sich die Zellen mit den Kv4.2-Konstrukten deutlich schlechter transfizieren ließen, deuten darauf hin, daß die Verarbeitung des Kv4.2-Proteins innerhalb der COS-7 Zellen problematischer ist oder sogar einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen ausübt. Es ist bekannt, daß die ER-Überladung durch Membranproteine Zellen in einen Streßzustand versetzt, der zur Aktivierung zweier alternativer Signalkaskaden, als Reaktion auf diesen Zustand, führen kann (Pahl und Baeuerle, 1997).

4.3.2. Elektrophysiologische Charakterisierung von Kv1.4/EGFP und Kv4.2/EGFP

Die elektrophysiologischen Charakterisierung der mit EGFP markierten Konstrukte Kv1.4/EGFP und Kv4.2/EGFP wurde in Zusammenarbeit mit der Diplombiologin Andrea Wulf durchgeführt. Dazu wurden die für die entsprechenden Konstrukte kodierenden Expressionsvektoren chemisch in CHO Zellen transfiziert (siehe 3.4.1.). Nach einer Inkubationsphase von 36-48 h wurden die durch die heterolog exprimierten Kv-Kanäle vermittelten makroskopischen Zellströme mit Hilfe der Patch-Clamp-Methode gemessen (siehe 3.7.). Die K^+-Auswärtsströme wurden in Abhängigkeit zu angelegten depolarisierenden Spannungspulsen gemessen. Dazu wurde das Potential der Plasmamembran auf –80 mV gehalten und die Membran im Bereich von –80 mV bis +60 mV durch Spannungspulse depolarisiert. Die Pulse wurden jeweils um 10 mV erhöht und für die Dauer von 500 ms verabreicht. Zur Kontrolle wurden unter gleichen Bedingungen die entsprechenden Messungen an den Wildtypkanälen durchgeführt. Für die Berechnung der kinetischen Konstanten wurden mindestens drei unabhängige Messungen berücksichtigt.

Die von den Konstrukten Kv1.4/EGFP und Kv4.2/EGFP resultierenden Stromkurven (Abbildung 10) zeigen die Charakteristik eines schnell-inaktivierenden Kv-Kanals.

Abbildung 10: **Stromkurven der mit EGFP markierten Kv-Kanäle**



Die Zeitkonstanten für die Aktivierung (τ_{max}) und Inaktivierung (τ_h) wurden in Kontrollexperimenten ebenfalls für die Wildtypkanäle unter den vorherrschenden Versuchsbedingungen bestimmt.

Dabei wurden für die Inaktivierung (mit $I = a \exp(\tau/\tau_{h1}) + b \exp(\tau/\tau_{h2})$) zwei Zeitkonstanten angepaßt. Durch τ_{h1} wird der schnelle Anteil und durch τ_{h2} der langsame Anteil des Kurvenverlaufes der Inaktivierung wiedergegeben (siehe Tabelle).

Zusammenfassung der Ergebnisse:	**Kv1.4**	**Kv1.4EGFP**	**Kv4.2**	**Kv4.2EGFP**
Zeitkonstante maximale Aktivierung τ_{max} [ms]	**2,7** ± *0,2*	**2,4** ± *0,1*	**3,2** ± *0,2*	**3,2** ± *0,3*
Zeitkonstanten der Inaktivierung τ_{h1} [ms]	**20,6** ± *2,7*	**20,3** ± *1,3*	**10,4** ± *4,5*	**15,9** ± *0,6*
τ_{h2} [ms]	**77,7** ± *8,0*	**67,6** ± *4,0*	**137** ±*21,5*	**148** ±*30,0*
Steady-state Aktivierung V_{50} [mV]	**-26,7** ± *5,0*	**-29,8** ± *5,6*	**- 3,4** ± *2,8*	**-10,4** ± *1,1*
Steigung (*slope*) [mV]	**-19** ± *1,8*	**-13,5** ± *4,5*	**-14,4** ± *1,5*	**-10,4** ± *1,2*
Steady-state Inaktivierung V_{50} [mV]	**-47,3** ± *3,4*	**-44,4** ± *2,2*	**-46,3** ± *4,1*	**-48,7** ± *0,4*
Steigung (*slope*) [mV]	**- 3,5** ± *0,4*	**- 3,4** ± *0,3*	**- 5,9** ± *1,5*	**- 4,0** ± *0,3*

Die steady-state Aktivierungs- und Inaktivierungskurven wurden mit Boltzman-Funktionen aus den ursprünglichen Daten berechnet (SIGMAPLOT, Jandel Scientific, San Rafael, CA). Aus diesen Kurven lassen sich die V_{50}-Werte ableiten, die Potentiale bei denen die Hälfte der Kanäle offen (Abbildung 11) bzw. inaktiviert (Abbildung 12) sind. Die Steigung stellt dabei ein Maß für die Spannungsabhängigkeit dar.

Abbildung 11: **Steady-state-Aktivierung Kv1.4/EGFP und Kv4.2/EGFP**

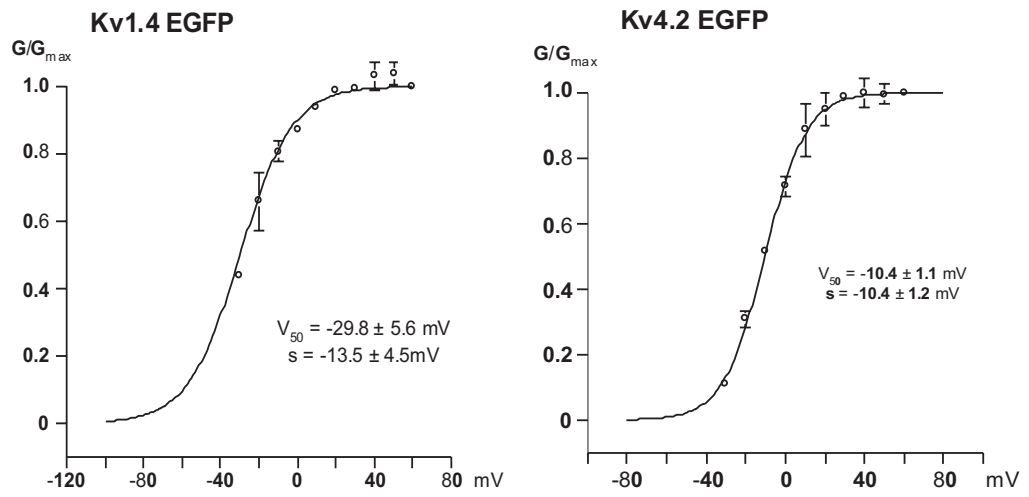
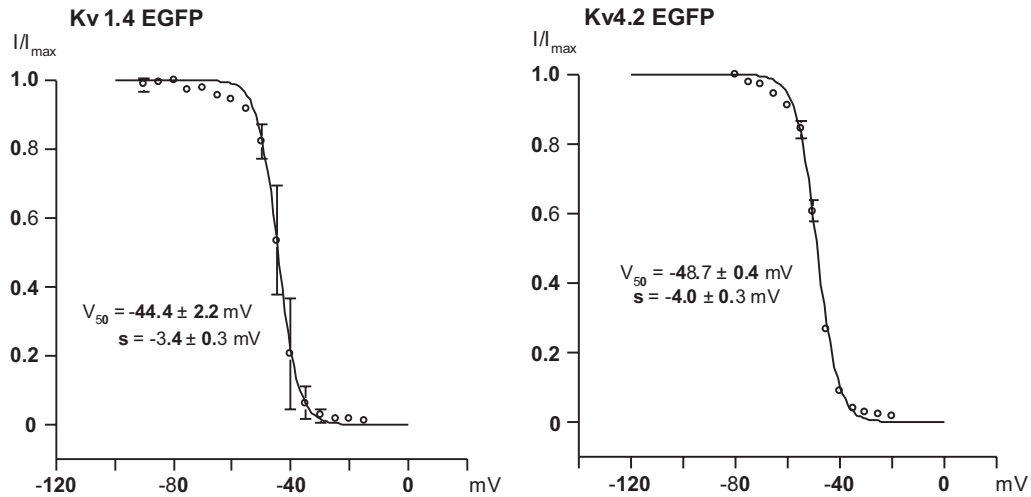


Abbildung12: **Steady-state-Inaktivierung für Kv1.4/EGFP und Kv4.2/EGFP**



Ein Vergleich der Meßergebnisse zeigt, daß die mit EGFP markierten Kv-Proteine nicht nur funktionale Kv-Kanäle bilden, sondern in Bezug auf ihre makroskopischen

Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken denen der durch die entsprechenden Wildtypkanäle vermittelten Ströme gleichen.

Eine weitere kinetische Charakteristik ist die Erholungsphase (*Recovery*), die vergeht bis Kv-Kanäle sich aus der Inaktivierung regenerieren und der ursprüngliche K^+-Strom wieder meßbar ist. Für den Kv1.4 ist die Erholungsphase mit einer schnellen Zeitkomponente τ_{R1} = 598 ms (Erholung aus der N-Typ Inaktivierung), nach der 68% des ursprünglichen K^+-Stromes regeneriert sind, und einer langsamen (Erholung aus der C-Typ Inaktivierung), die im Bereich von mehreren Sekunden liegt, beschrieben (Baukrowitz und Yellen, 1995; Roeper et al., 1997). Die schnelle Zeitkomponente der Kv4.2-Erholungsphase liegt dagegen im Bereich von 100 ms, wobei ein größerer Anteil des ursprünglichen K^+-Stromes regeneriert wird (etwa 85%). Die Erholungsphase der durch die Konstrukte Kv1.4/EGFP und Kv4.2/EGFP gebildeten Kv-Kanäle wurde ebenfalls nachgewiesen. Es wurden jedoch nicht genügend Messungen durchgeführt, um eine genaue Quantifizierung der Erholungsphase durchzuführen. Die Ergebnisse dieser Messungen deuten aber darauf hin, daß die mit EGFP markierten Kanäle im Vergleich zu dem komplementären Wildtypkanal mindestens die zweifache Zeit zur Erholung aus der Inaktivierung benötigen.

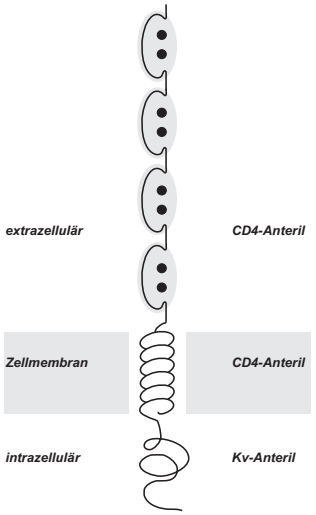
4.4. Konstruktion von Chimären aus CD4-Rezeptor und Kv α-Untereinheiten

Der gerichtete Proteintransport des Kv1.4 α-Proteins im MDCK-Modell deutet auf die Existenz einer transportbestimmenden Domäne innerhalb des zytoplasmatisch orientierten carboxyterminalen Proteinbereiches hin (*siehe Einleitung*). Die Markierung mit EGFP am carboxyterminalen Ende der Kv1.4/EGFP- und Kv4.2/EGFP-Konstrukte könnte unter Umständen den carboxyterminalen Bereich derartig maskieren, daß die Proteine nicht mehr gerichtet transportiert werden können. Dagegen ist ein indirekter Transport über endogene Kv-Proteine denkbar, wenn die mit EGFP markierten Kv α-Proteine nach der heterologen Genexpression über die Tetramerisierungsdomänen mit diesen in Wechselwirkung treten und mitgenommen werden. Um einen derartigen indirekten Transport zu vermeiden und um den möglichen Nachteil einer carboxyterminalen Maskierung zu umgehen, wurden alternative Expressionskonstrukte generiert.

Zu diesen Zweck wurden Teile der cDNAs des CD4-Rezeptors (Hodge et al., 1991; Acc.: M35160) und der Kv1.4 α- bzw. Kv4.2 α-Untereinheiten so kloniert, daß in den daraus resultierenden chimären Proteinen der zytoplasmatische Teil des CD4-Rezeptors

durch den carboxyterminalen Bereich eines Kv-Proteins, Kv1.4 oder Kv4.2, ausgetauscht ist (Abbildung 13).

Abbildung 13: **Struktur der CD4-Chimären**

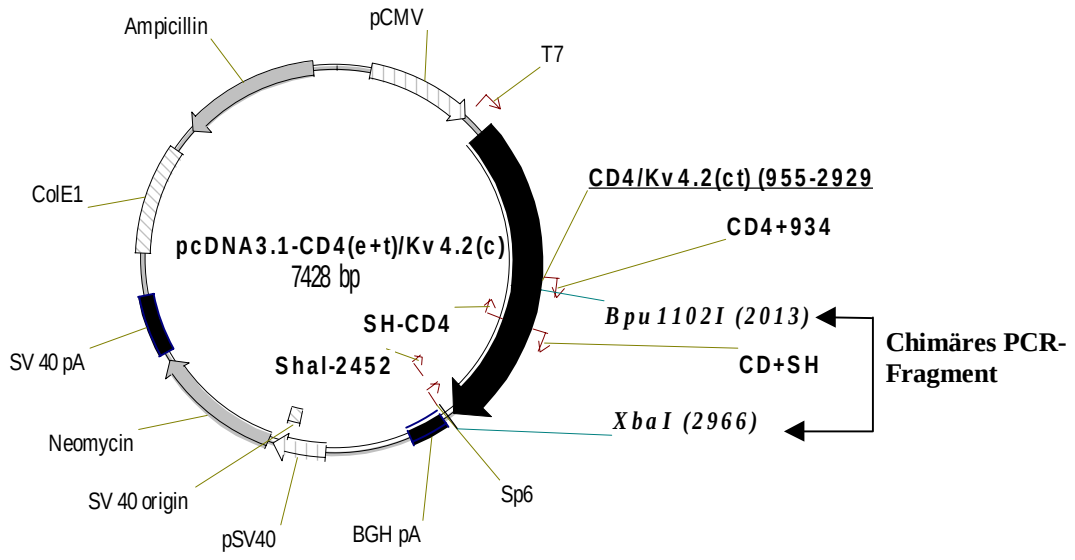


Die cDNA des CD4-Rezeptors (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. J. Merot, Centre D'Etudes de Saclay, Gif sur Yvette, Frankreich) wurde mit den Restriktionsenzymen Hind III und BamH I verdaut und einen entsprechend prozessierten pcDNA3.1-Expressionsvektor kloniert (pcDNA3.1-CD4-Rezeptor, Klonkarte siehe Anhang).

Das chimäre Konstrukt CD4(ex+tm)/Kv4.2(ct) wurde in Analogie zu der Methode der gerichteten *in vitro* Mutagenese (siehe 3.1.19.) hergestellt. Dabei wurden zunächst der 5'-Bereich des chimären Konstruktes (1. PCR: *Template:* pcDNA3.1-CD4-Rezeptor; *Primer P1:* CD4+934, *chimärer Mutationsprimer M2:* SH-CD4, siehe 2.3.) und der 3'-Bereich (2. PCR: *Template:* pcDNA3.1-Kv4.2; *Primer P2:* Shal-2452, *chimärer Mutationsprimer M1:* CD4+SH) synthetisiert. Anschließend wurden beide PCR-Produkte durch eine überlappende PCR (*Primer P1 und P2 wie oben*) aneinandergelagert. Das resultierende PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen Bpu1102 I und Xba I verdaut und in das komplementär restringierte (pcDNA3.1-CD4-Rezeptor)-Fragment kloniert (pcDNA3.1-$CD4_{(ex+tm)}$/$Kv4.2_{(ct)}$ siehe Abbildung 14).

Das in Analogie zu dem oben dargestellten Verfahren hergestellte Konstrukt $CD4_{(ex+tm)}$/$Kv1.4_{(ct)}$ wurde von Dr. J. Merot zur Verfügung gestellt und war in einen pcB6-Expressionsvektor (siehe Le Maout et al., 1997) kloniert worden.

Abbildung 14: **Klonierung pcDNA3.1-CD4$_{(ex+tm)}$/Kv4.2$_{(ct)}$**



In den resultierenden Konstrukten CD4$_{(ex+tm)}$/Kv4.2$_{(ct)}$ und CD4$_{(ex+tm)}$/Kv1.4$_{(ct)}$ ist der gesamte carboxyterminale Bereich der Kv-Proteine verhanden, beginnend bei dem Übergang von S6 in den zytoplasmatisch orientierten Proteinbereich, der für die Kv1.4 und Kv4.2 α-Untereinheit keine Homologie zueinander innerhalb der Aminosäuresequenz erkennen läßt (Abbildung 15).

Die chimären Konstrukte sind nicht in der Lage funktionale Kanäle zu bilden oder mit endogenen Kv α-Proteinen in Wechselwirkung zu treten. Weder in Gewebekulturzellen (CHO, COS, HEK293) noch in Neuronen des ZNS (Hippocampus und Cortex) wurde das CD4-Rezeptorprotein endogen nachgewiesen. Dadurch ist es möglich die heterlog exprimierten CD4-Konstrukte mit einem spezifisch gegen den CD4-Rezeptor gerichteten Antikörper (SIM 2.1.1; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. J. Merot), der ein Epitop innerhalb des extrazellulären Bereiches des CD4-Rezeptorproteins erkennt, durch die Methode der Immunhistochemie (siehe 3.5.) nachzuweisen.

Ein potentieller gerichteter Proteintransport dieser Proteine sollte nur aufgrund des aus den Kv α-Untereinheiten stammenden zytoplasmatischen Proteinbereiches erfolgen. Zur Kontrolle dieser Hypothese wurde eine verkürzte Variante des CD4-Rezeptorproteins, das CD4$_{stop}$, konstruiert. Durch die Methode der gerichteten *in vitro* Mutagenese (siehe 3.1.18.) wurde ein Stopcodon so in den Leserahmen eingeführt (siehe 2.3. Oligonukleotide CD4Δ42 und 42ΔCD4), daß in dem resultierenden Protein nur der extrazelluläre und membrandurchspannende Bereich des CD4-Rezeptors exprimiert wird (Abbildung 15, Klonkarte pcDNA3.1-CD4$_{stop}$ im Anhang).

Abbildung 15: **Sequenzvergleich der CD4-Fusionsproteine**

```
            1 ◄──● extrazellulär ●──────────────────────►  401
cd4stop     MNRGVPFRHL LLVLQLALLP ...GQVLL ESNIKVLPTW STPVQPM ALIV
cd4-Kv1.4   MNRGVPFRHL LLVLQLALLP ...GQVLL ESNIKVLPTW STPVQPM ALIV
cd4-Kv4.2   MNRGVPFRHL LLVLQLALLP ...GQVLL ESNIKVLPTW STPVQPM ALIV

            membrandruchspannend  ◄──● zytoplasmatisch ●──►
cd4stop     LGGVAGLLL FIGLGIFFCV R* ~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~
cd4-Kv1.4   LGGVAGLLL FIGLGIFFCV RC NFNYFYHR ETENEEQTQL TQNAVSCPYL
cd4-Kv4.2   LGGVAGLLL FIGLGIFFCV RC NFSRIYHQ NQRADKR.RA QKKARLARIR

            451                                                 500
cd4stop     ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~
cd4-Kv1.4   PSNLLKKFRS STSSSLGDKS EYLEMEEGVK ESLCGKEEKC QGKGDDSETD
cd4-Kv4.2   AAKSGSANAY MQSKRNGLLS NQLQSSEDEP AFVSKSGSSF ETQHHHLLHC

            501                                                 550
cd4stop     ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~
cd4-Kv1.4   KNNCSNAKAV ETDV*~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~
cd4-Kv4.2   LEKTTNHEFV DEQVFEESCM EVATVNRPSS HSPSLSSQQG VTSTCCSRRH

            551                                                 600
cd4stop     ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~
cd4-Kv1.4   ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~
cd4-Kv4.2   KKSFRIPNAN VSGSHRGSVQ ELSTIQIRCV ERTPLSNSRS SLNAKMEECV

            601                                               647
cd4stop     ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~
cd4-Kv1.4   ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~
cd4-Kv4.2   KLNCEQPYVT TAIISIPTPP VTTPEGDDRP ESPEYSGGNI VRVSAL*
```

Im MDCK-Modell wurde das $CD4_{stop}$-Protein nicht gerichtet transportiert, während das $CD4_{ex+tm}$-$Kv1.4_{ct}$-Konstrukt genauso wie das CD4-Rezeptor- oder aber das Kv1.4-Wildtyp-Protein gerichtet basolateral transportiert wurden (persönliche Mitteilung von Dr. J. Merot).

4.5. Interaktion der CD4-Chimären mit PSD-95

Eine Reihe von Ionenkanälen und Neurotransmitterrezeptorproteine weisen am Carboxyterminus eine identische Peptidsequenz, das -X-(S/T)-X-V-Motiv (X steht für irgendeine unpolare und hydrophobe Aminosäure), auf. Speziell bei den spannungsabhängigen K^+-Kanälen wird dieses Motiv bei Mitgliedern der Kv1 α-Subfamilie nachgewiesen (Kv1.1 bis Kv1.4). Über dieses Motiv können diese Ionenkanäle an bestimmte Proteinbereiche, die PDZ-Domänen, binden (Sheng und Kim, 1996 Kornau et al., 1997). Verschiedene PDZ-Domänen sind in einer Reihe von löslichen Proteinen identifiziert worden, wobei das Kv1.4 α-Protein besonders hohe Affinität zur mittleren von

insgesamt drei PDZ-Domänen im PSD-95 Protein zeigt (Niethammer et al., 1998). Das PSD-95 (***p**ost **s**ynaptic **d**ensity-**95***, Cho et al., 1992), auch als SAP-90 (***s**ynaptic **a**ssociated **p**rotein-**90***, Kistner et al., 1993) bezeichnet, wurde aus synaptischen Proteinfraktionen des Gehirns isoliert und auch am Ort der postsynaptischen Verdichtungen elektronenmikroskopisch lokalisiert. Das PSD-95 stellt ein Gerüstprotein dar, das mit weiteren Proteinen in Wechselwirkung treten kann, wie beispielsweise mit dem CRIPT Protein, wodurch eine feste Verbindung zum Zytoskelett entsteht (Ehlers et al., 1996; Sheng und Wyszynski, 1997). Die Interaktion zwischen Kv1.4 und PSD-95 führt damit zur Fixierung der K^+-Kanäle am Zytoskelett und gleichzeitig zur lokalen Anhäufung, allgemein als „clustern" bezeichnet, am Ort ihrer Funktion.

Um nachzuweisen, daß der in dem chimären Protein $CD4_{ex+tm}$-$Kv1.4_{ct}$ enthaltende carboxyterminale Proteinbereich ebenfalls diese Funktionalität des Kv1.4-Proteins aufweist, wurde die Fähigkeit zur Interkation mit PSD-95 nach heterologer Genexpression in COS-7 Zellen untersucht. Dazu wurden die für das PSD-95 kodierende cDNA (Acc.: M96853) über die Restriktionsschnittstellen Acc65 I und Not I in einen pcDNA3.1-Expressionsvektor kloniert (pcDNA3.1-PSD 95 siehe Anhang).

Durch chemische Kotransfektionen (siehe 3.4.1.) wurde der pcDNA3.1-PSD-95-Expressionsvektor zusammen mit dem pcDNA3.1-Kv1.4- oder aber dem pcDNA3.1-$CD4_{ex+tm}$-$Kv1.4_{ct}$-Vektor in COS-7 Zellen transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48, 60 oder 72 h wurden die Zellen fixiert und immunhistochemisch untersucht (siehe 3.5. und 3.6.).

Während das heterolog exprimierte Kv1.4-Protein nach 48 h eindeutig in den inneren Membranen mit einer starken Dominanz im Bereich des kernnahen endoplasmatischen Retikulums lokalisiert wird (siehe 4.3.1., Bild D), zeigt PSD-95 nach 48 h ein homogenes Expressionsmuster über die gesamte Zelle (Bild G). Werden Kv1.4 und PSD-95 in einer Zelle gleichzeitig, exprimiert läßt sich nach 60 h ein deutlich verändertes, gepunktetes Expressionsmuster beobachten. Kv1.4 ist innerhalb der Zelle lokal konzentriert (Bild H), welches durch den Effekt des „clustern" beschrieben werden kann. Durch Doppelmarkierungsexperimente läßt sich nachweisen, daß in dem Großteil dieser Punkte PSD-95 und Kv1.4 zusammen lokalisiert sind (Bild I). Der gleiche Effekt läßt sich nach einer Kotransfektion von $CD4_{ex+tm}$-$Kv1.4_{ct}$ und PSD-95 beobachten (Bild J), wodurch auch nachgewiesen wurde, daß diese Chimäre die Fähigkeit zur Interaktion mit PSD-95 besitzt und damit am carboxyterminalen Proteinbereich die Funktionalität des Kv1.4-Proteins aufweist. Obwohl für das Kv4.2 α-Protein ebenfalls der Effekt des „clustern" beschrieben

Interaktion der CD4-Chimären mit PSD-95:

Bild G: anti-mPSD-95

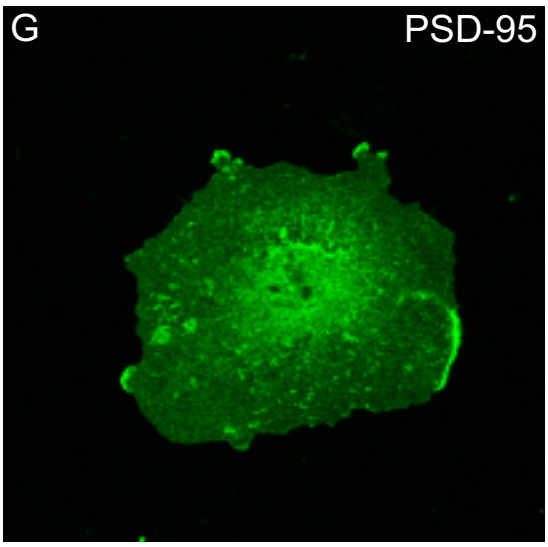


Bild H: anti-rKv1.4

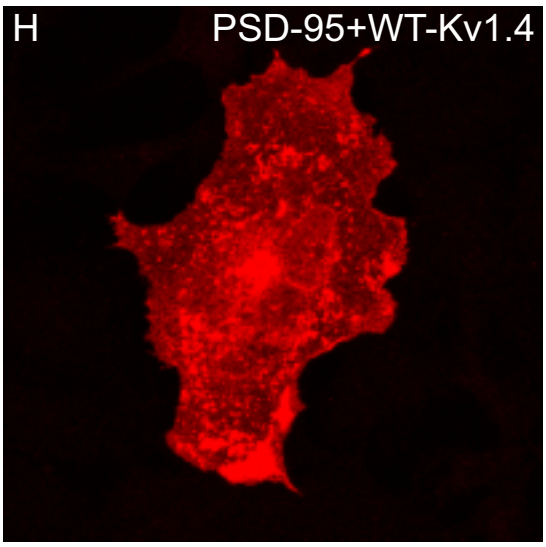


Bild I: anti-mPSD-95+anti-rKv1.4

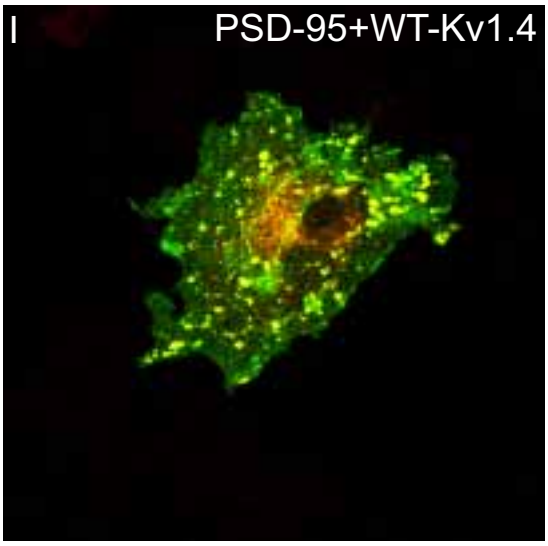
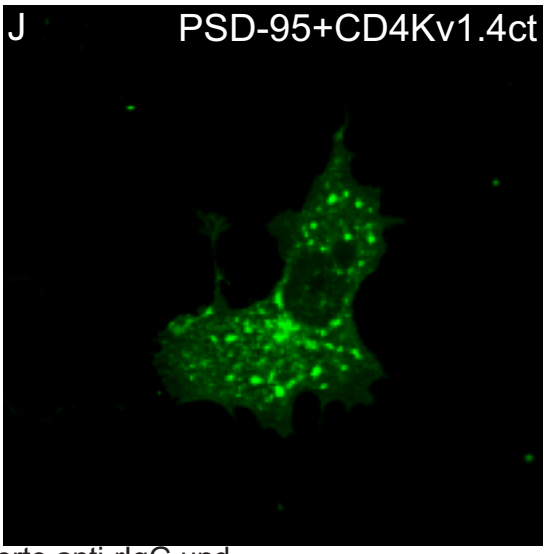


Bild J: anti-mPSD-95



rote Fluoreszenzsignale durch mit Cy3 konjugierte anti-rIgG und
grüne Fluoreszenzsignale durch mit Cy2 konjugierte anti-mIgG Zweitantikörper

worden ist (Alonso und Widmer, 1997), konnte bisher kein Interaktionspartner identifiziert werden. So wurde für das Kv4.2 bzw. das $CD4_{ex+tm}$-$Kv4.2_{ct}$ nach der Kotransfektion mit PSD-95 keine Veränderung der Expressionsmuster festgestellt. Ebenfalls unverändert bleibt das Expressionsmuster des Kv1.4/EGFP, nachdem es mit PSD-95 zusammen heterolog exprimiert worden war. Dieses ist auf die Maskierung des distalen carboxyterminalen Proteinbereiches durch die Fusion mit EGFP zurückzuführen.

4.6. Palmitylierung einer Kv β-Untereinheit

Die Interkation zwischen Kv1.4 und PSD-95 hat scheinbar keinen Einfluß auf den Membrantransport von Kv1.4. Beide Proteine gelangen unabhängig voneinander in die Plasmamembran und treten auch dort erst in Wechselwirkung miteinander (Topinka und Bredt, 1998). Der Membrantransport von PSD-95 wird dabei über eine aminoterminale Palmitylierung reguliert. Obwohl keine allgemeingültige Erkennungssequenz für die Modifikation von Proteinen mit Palmitinsäure bekannt ist, so wird doch die Palmitylgruppe in allen derartig modifizierten Proteinen über die Veresterung der Thiolgruppe eines aminoterminalen Cysteins (innerhalb der ersten zehn Aminosäuren am N-Terminus) eingeführt. Der Effekt der Palmitylierung führt in diesen Proteinen zum Membrantransport und damit zur Lokalisation am Ort ihrer Funktionen (Wedegaertner und Bourne, 1994; van't Hof und Resh, 1997). PSD-95 verfügt über zwei Cysteine im aminoterminalen Proteinbereich, an Position drei und fünf. Ob beide oder nur ein Cystein palmityliert wird, ist bisher nicht bekannt, aber zumindest unterdrückt der Austausch von nur einem der beiden Cysteine gegen Serin diese postranslationale Modifikation des PSD-95.

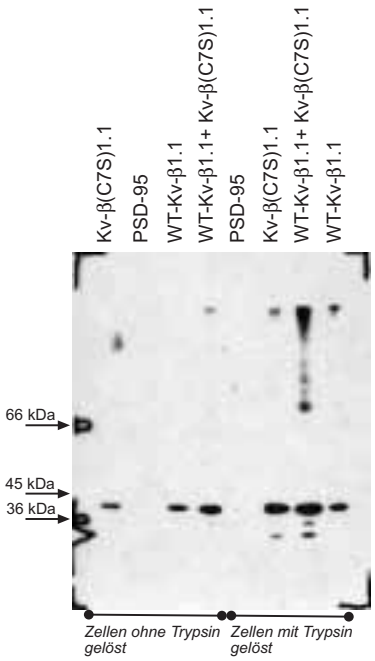
Ein weiteres Effektorprotein der Kv1.4 α-Untereinheit ist die Kv1.1 β-Untereinheit. Sie verfügt ebenfalls über ein aminoterminal lokalisiertes Cystein (siebte Aminosäure). Obwohl Kv1.1 β ein kleines lösliches Protein ohne ausgeprägte hydrophobe Eigenschaften ist, und die Interaktion von Kv1.1 β und Kv1.4 α scheinbar keinen Einfluß auf den Proteintransport der α-Untereinheit hat, so wird Kv1.1 β doch hauptsächlich als an den Membranen assoziiertes Protein nachgewiesen. Der Ort, an dem es zur ersten Interaktion beider Proteine kommt, und die Ursache für die Membranlokalisation von Kv1.1 β sind unbekannt. Da für eine andere β-Untereinheit eines Ionenkanals, die L-Typ Ca^{2+}-Kanal β_{2A}-Untereinheit, die Palmitylierung eines aminoterminal lokalisierten Cystein nach-

gewiesen worden war (Chien et al., 1996), wurde eine potentielle Palmitylierung der Kv1.1 β-Untereinheit näher untersucht.

Während der Expressionsvektor pcDNA3.1-Kv1.1 β zur Verfügung stand, mußte die cDNA des Kv1.1 $\beta_{(C7S)}$-Proteins vom pAKS2-Vektor in einen Expressionsvektor transferiert werden. Dazu wurde der pAKS2-Kvβ1-Vektor mit BamH I und Hind III restringiert. Die beiden resultieren DNA-Fragmente (5'-(Hind III/Hind III)-Fragment mit einer Größe von 790 bp und 3'-(Hind III/BamH I)-Fragment mit einer Größe von 788 bp) wurden gleichzeitig mit dem (Hind III/BamH I)-Vektorfragment eines pcDNA3.1-Expressionsvektor ligiert (Vektorkarte pcDNA3.1-Kv1.1 β_{C7S} siehe Anhang).

Die Expressionsvektoren wurden chemisch in CHO- und COS-7 Zellen transfiziert (siehe 3.4.1.) und diese nach 48 h und 72 h Transfektionszeit in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und proteinchemisch analysiert (siehe 3.2.). Der Effekt der Palmitylierung sollte anhand eines veränderten Laufverhaltens unter den Bedingungen der diskontinuierlichen SDS-PAGE (siehe 3.2.1.) nachzuweisen sein. Für die β_{2A}-Untereinheit des L-Typ Ca^{2+}-Kanals (Proteinmasse ohne Modifikation 68 kDa) wurde ein verändertes Laufverhalten entsprechend einer 2-4 kDa größeren Proteinmasse festgestellt. Der Nachweis der heterolog exprimierten Kv1.1 β- und Kv1.1 $\beta_{(C7S)}$-Proteine nach Western-Blot-Analyse (siehe 3.2.2.) zeigt jedoch keine Veränderung des Laufverhaltens in einem 9%igem (Abbildung 16, Proteinproben aus COS-7 Zellen) oder 12,5 %igem (ohne Abbildung) Polyacrylamidgel.

Abbildung 16: Elektrophoretische Auftrennung von WT-Kv-β1.1 und Kv-β(C7S)1.1



Für beide Proteine wurde eine Masse von etwas weniger als 45 kDa detektiert, wonach der Effekt einer Palmitylierung für das Kv1.1β-Protein ausgeschlossen werden kann, denn bei einer Massenverschiebung um etwa 3 kDa im Bereich von 40-50 kDa sollte dieser Unterschied durch Western-Blot-Analyse deutlich nachzuweisen sein.

4.7. Heterologe Genexpression im Neuron

Neuronen sind hochdifferenzierte und postmitotische Zellen (*siehe Diskussion*). Diese Umstände begründen auch die Tatsache, daß die üblichen Bedingungen der heterologen Genexpression in Neuronen nicht bzw. nur sehr schlecht anwendbar sind.
Bei der Entwicklung eines neuronalen Expressionsystems wurden deshalb verschiedene Methoden des Gentransfers in entsprechend dafür geeigneten Neuronen angewendet.

4.7.1. Chemische Transfektion in primärkultivierte hippocampale Neuronen

Sowohl die Kalziumphosphat-Methode (siehe 3.4.1.1.) als auch die Transfektion mit kationischen Lipid-Reagentien (siehe 3.4.1.2.) wurde an primärkultivieren hippocampalen Neuronen embryonalen Ursprungs (siehe 3.3.2.) getestet. In Einzelfällen wurde das heterolog exprimierte EGFP 24 h nach der Transfektion innerhalb eines fixierten Neurons (siehe 3.5.1.) nachgewiesen. Jedoch gelang es nicht die Methode der chemischen Transfektion so zu optimieren, daß höhere Ausbeuten als 0,01% oder aber reproduzierbare Ergebnisse erzielt wurden. Ein weiterer Nachteil dieser Methode war die scheinbar zytotoxische Wirkung der Reagentien sowie die durchzuführenden Waschschritte und Medienwechsel, so daß in den behandelten Kulturen 48 h nach der Transfektion kaum noch vitale Neuronen nachgewiesen wurden (siehe 3.3.6.).

4.7.2. Mikroinjektion in primärkultivierte Neuronen der Oberen Zervikalganglien

In einem zweiten Ansatz wurde eine Methode des mechanischen Gentransfers getestet. Dabei wurden entweder Expressionsvektoren, die für die entsprechenden Kv α-Konstrukte

(Kv1.4/EGFP, Kv4.2/EGFP und $CD4_{(ex+tm)}$/$Kv1.4_{(ct)}$) bzw. EGFP allein kodierten, oder aber die entsprechende cRNA durch Mikroinjektion in Neuronen transferiert (siehe 3.4.2.). Aufgrund der Zellgröße ließen sich dabei nur primärkultivierte Neuronen (SCG-Neuronen) aus den Oberen Zervikalganglien (***s**uperior **c**ervical **g**anglion*) junger Ratten (siehe 3.3.4.) injizieren. Mit dieser Methode wurden das EGFP und die mit EGFP markierten Kv α-Proteine reproduzierbar heterolog exprimiert. In der Regel wurden 90 Injektionsversuche pro Kultur durchgeführt, bevor durch die Bedingungen der Mikroinjektion merkliche pH- oder Temperaturschwankungen auftraten. Dabei wurden Ausbeuten von etwa 5%, bezogen auf die Anzahl der Injektionsversuche, erzielt. Das bedeutet, daß diese Methode zwar zur heterologen Genexpression im Neuron anwendbar, jedoch aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes für die Durchmusterung einer Reihe von Deletionsmutanten in Bezug auf die Fragestellung des gerichteten Proteintransportes ungeeignet ist.
Ein weiterer Nachteil dieser Methode liegt in der Natur der zu verwendenden SCG-Neurone. Die heterolog exprimierten Kanalkonstrukte wurden 8 h (cRNA) bzw. 36 h (cDNA) nach der Injektion in sämtlichen Zellkompartimenten der SCG-Neurone nachgewiesen, dabei wurde kein unterschiedliches Verhalten zwischen den Kv1.4 α- und den Kv4.2 α-Konstrukten bezüglich eines gerichteten Proteintransportes festgestellt. Dieses kann an der in Kultur schwach ausgebildete Zellpolarität (siehe 4.8.) dieses Neuronentyps begründet sein, der in nativer Umgebung sogar nur einen pseudounipolaren Charakter aufweist.

4.7.3. Virale Proteinexpression im Neuron

Die Methode des viralen Gentransfers ist eine gute Lösung eine heterologe Genexpression im Neuron zu erreichen (Werner et al., 1990), jedoch unterliegen Arbeiten mit neuropathogenen Viren in der Regel höheren Sicherheitsbestimmungen als S1. Für eine Variante des Semliki Forest Virus wurde ein virales Expressionssystem entwickelt (Berglund et al.; 1993), das die Handhabung dieser Virusvariante, bei Infektion eukaryonter Zellen der Risikogruppe 1, unter den S1-Laborsicherheitstandards und ohne zusätzliche Umgangsgenehmigung für Arbeiten mit infektiösen Material erlaubte (Robert-Koch-Institut, 1996).

4.7.3.1. Semliki Forest Virus Expressionssystem

Beim Semliki Forest Virus (SFV) Expressionssystem wurde das virale Genom auf zwei Expressionsvektoren, dem pSFV-1 (kodiert für Enzyme, die virale RNA modifizieren) und dem pSFV-helper2 (kodiert für die Strukturproteine), verteilt. Durch die Deletion des Verpackungssignals auf dem Vektor pSFV-helper2 wird die Fähigkeit zur Selbstreplikation der rekombinant erzeugten Viren weitestgehend unterdrückt. Die zusätzliche Mutation des Gens für das Vorläuferprotein p62 (Einführung von drei Punktmutationen, Glasgow et al., 1991) verhindert die autokatalytische Reifung des Strukturproteins E2. Das führt dazu, daß die erzeugten Viren nicht in der Lage sind Wirtszellen zu infizieren. Die Spaltung des Vorläuferproteins p62 kann durch enzymatische Behandlung der rekombinanten Viren *in vitro* durchgeführt werden (siehe 3.4.3.2.), wodurch infektiöse Viren entstehen. Durch diese Modifikationen des viralen Genoms, sind auch die durch Rekombination entstehenden selbstreplikationsfähigen rekombinanten Viren nicht in der Lage mehr als einen Infektionszyklus zu durchlaufen.

4.7.3.2. Anwendung und Optimierung des SFV-Expressionssystems

Die zu exprimierenden cDNAs wurden durch enzymatische Behandlung mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (siehe unten) aus den pcDNA3.1-Expressionsvektoren herausgeschnitten, die cDNA-Enden aufgefüllt (siehe 3.1.6.) und stumpf in einen mit Sma I restringierten pSFV-1 Expressionsvektor ligiert:

(Hind III/Not I)$_{stumpf}$-EGFP	$\rightarrow$	pSFV-EGFP
(Hind III/EcoR I)$_{stumpf}$-Kv1.4/EGFP	$\rightarrow$	pSFV-Kv1.4/EGFP
(EcoR I)$_{stumpf}$-Kv4.2/EGFP	$\rightarrow$	pSFV-Kv4.2/EGFP
(BamH I)$_{stumpf}$/EcoR V-CD4/Kv1.4$_{ct}$	$\rightarrow$	pSFV-CD4/Kv1.4$_{ct}$
(Hind III/Not I)$_{stumpf}$-CD4-Rezeptor	$\rightarrow$	pSFV-CD4-Rezeptor
EcoR V/(Xba I)$_{stumpf}$-Cd4$_{stop}$	$\rightarrow$	pSFV-CD4$_{stop}$

Die Klonierung des pSFV-CD4/Kv4.2$_{ct}$ erfolgte über PCR und ist zusammen mit den übrigen Klonkarten der resultierenden pSFV-Expressionsvektoren im Anhang wiedergegeben.

Die entsprechenden Viren (SFV-EGFP, SFV-Kv4.2/EGFP, SFV-CD4/Kv1.4$_{ct}$, SFV-CD4/Kv4.2$_{ct}$, SFV-CD4-Rezeptor, SFV-CD4stop und SFV-Kv1.4/EGFP) wurden in

COS-7 Zellen rekombinant erzeugt (siehe 3.4.3.1.). Die erhaltenen inaktiven Viruslösungen konnten bei 4^0C gelagert werden, wobei der Titer der Viruslösungen (siehe 3.4.3.4.) über zwei Wochen stabil blieb, bevor er langsam abnahm.

Bei der Infektion von primärkultivierten hippocampalen Neuronen wurde in Abhängigkeit zum Virustiter ein Aliquot der Viruslösung aktiviert (optimierte Bedingungen der Virusaktivierung siehe 3.4.3.2.), das zur Infektion von theoretisch 5-10 % der in der Kultur vorkommenden Neuronen ausreichte. Durch diese geringe Infektionsausbeute sollte gewährleistet sein, daß sich die neuronalen Ausläufer von infizierten Neuronen nicht überlagerten (Tienari, P.J., et al.; 1996). Die Bedingungen der Infektion (siehe 3.4.3.3.) wurden nicht in Bezug auf eine möglichst hohe Expressionsausbeute, sondern mit Rücksicht auf eine möglichst geringe Beanspruchung der Neuronenkultur optimiert. Dabei erwies es sich als besonders schonend die aktivierte Viruslösung, nachdem durch Zugabe von Aprotinin das Chymotrypsin inhibiert worden war, direkt auf die Neuronen zu pipettieren. Die Neuronen wurden 1,5 h unter Standardbedingungen kultiviert (siehe 3.3.2.4.), bevor das infektiöse Medium durch frisches Kulturmedium ersetzt wurde. Längere Inkubationszeiten mit dem infektiösen Medium führten zu einer deutlich verminderten Lebensdauer der Neuronen. Etwa 3 h nach der Applikation des Virus wurden die ersten heterolog exprimierten Proteine nachgewiesen. Für das kleine, lösliche EGFP wurde eine durchschnittliche Infektionsphase von 4,5 h und für die Kv-Konstrukte eine von etwa 6,5 h als optimal etabliert. Zwar wurden bei Infektionsphasen von bis zu 18 h in mindestens der doppelten Anzahl von Neuronen die heterologe Genexpression nachgewiesen, jedoch war der zytotoxische Effekt der längeren Virusinfektion in diesen Kulturen schon deutlich sichtbar. Ein wesentlicher Nachteil des viralen Expressionssystems liegt in den starken viralen Promotoren, die innerhalb kurzer Zeit dazu führen, daß vorwiegend die vom Virusgenom kodierten Proteine synthetisiert werden (Liljeström and Garoff, 1991). Die vorübergehende Blockierung der Proteinsynthese durch Applikation von Cycloheximid (siehe 3.4.3.3.) führte zwar nachweislich zum Abbruch der heterologen Genexpression, hatte jedoch ebenfalls einen zytotoxischen Effekt auf die Neuronen. Die Zytotoxizität äußerte sich zuerst in dem Einfahren der neuronalen Ausläufer, wobei immer größere Bereiche des Neurons den Kontakt zum Deckglas verloren, bis selbst der inzwischen aufgeschwemmte Zellkörper den Kontakt zur Kulturfläche verlor. Wurde nach der Virusinfektion eine immunhistochemische Behandlung (siehe 3.5.) der Neuronen durchgeführt, wie es beispielsweise für den Nachweis der heterolog exprimierten CD4-Konstrukte notwendig war, wurden durch die

verschiedenen Waschschritte nach und nach auch die nur leicht beschädigten Neuronen vom Deckglas gespült. Eine alternative Beschichtung der Deckgläser mit Poly-D-Lysin, Fibronection oder/und Laminin (siehe 3.3.2.3.) brachte dabei keine Veränderung. Auch das Einbetten der Neuronen in Matri-Gel wurde getestet, allerdings offenbarte dieses Verfahren enorme Nachteile bei der anschließenden immunhistochemischen Behandlung, da der fluoreszierende Zweitantikörper sich nur unvollständig aus der Gelmatrix waschen ließ. Dadurch und durch das dichtere Medium zwischen Deckglas und Objektträger wurden bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der heterolog exprimierten Proteine schlechtere Signal-Rausch-Verhältnisse erzielt.

In Bezug auf die Fragestellung eines gerichteten Proteintransportes ist es wichtig die heterologe Genexpression zu einem Zeitpunkt zu stoppen, an dem die Transport- bzw. Sortierungsmechanismen der Neuronen noch nicht mit den heterolog exprimierten Proteinen übersättigt sind. Aufgrund der vom Virus induzierten heterologen Proteinsysnthese kann der gerichtete Proteintransport nur für die initial synthetisierete Menge an heterolog exprimierten Proteinen gewährleistet sein. Danach kommt es zur Übersättigung des endoplasmatischen Retikulums und Golgiapparates, welches einen ungerichteten Proteintransport zur Folge hat. Bei Infektionszeiten von 4,5 bzw. 6,5 h wurden in nur einigen der infizierten Neuronen die heterolog exprimierten Proteine in sämtlichen Bereichen der Zelle lokalisiert, in anderen dagegen wurden die heterolog exprimierten Proteine, ausgehend vom Zellkörper, nur partiell in den Ausläufern lokalisiert.

Ein Vergleich zwischen Neuronen, die EGFP (Bild K) und Neuronen die mit Kv4.2/EGFP (Bild L) bzw. Kv1.4/EGFP (Bild M), zeigt die unterschiedliche Verteilung von heterolog exprimierten löslichen Proteinen und membrangebundenen Proteinen. Während das EGFP nach einer relativ kurzen Infektionsphase selbst in den distalen Ausläufern des Neurons nachgewiesen wird, sind die Kv-Konstrukte vorwiegend im Bereich des kernnahen Zellkörpers lokalisiert. Ein Unterschied in der Verteilung der heterolog exprimierten Kv4.2/EGFP- und Kv1.4/EGFP-Proteine wurde unter diesen Bedingungen nicht festgestellt.

Ein weiteres Problem des viralen Gentransfers ist die ungerichtete Infektion sämtlicher Zelltypen, die in der verwendeten Neuronenkultur (siehe 3.3.3.) vorkommen. So wurden auch Gliazellen (Oligodendrozyten und Astrozyten), Fibroblasten und andere neuronale Zellen mit minderer Zellpolarität (siehe 4.8.) infiziert. Dabei war es nicht immer, wie im Falle des mit SFV-Kv4.2EGFP infizierten Astrozyten (Bild N), möglich den Zelltyp bzw.

Heterologe Genexpression von EGFP, Kv1.4/ und Kv4.2/EGFP im Neuron:

Bild K: EGFP, 4,5h nach Infektion

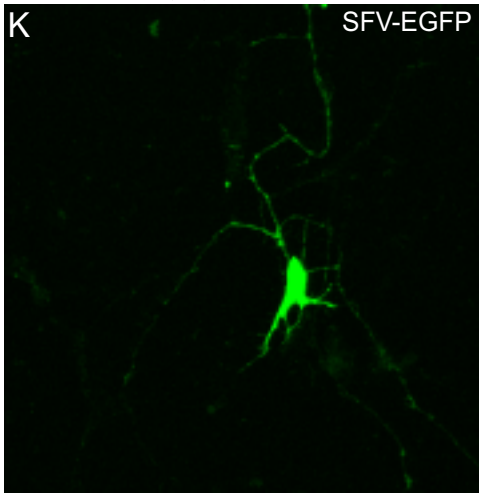


Bild L: Kv4.2/EGFP, 4,5h nach Infektion

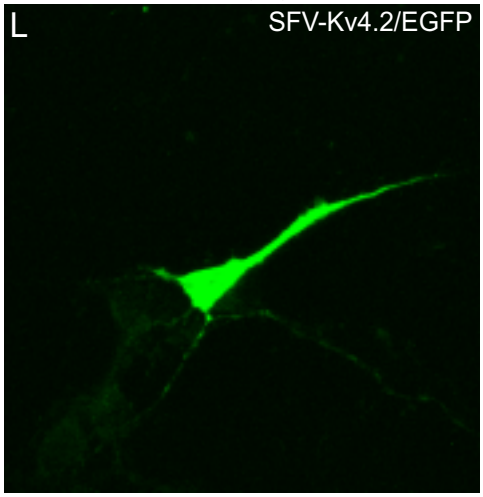


Bild M: Kv1.4/EGFP, 6,5h nach Infektion

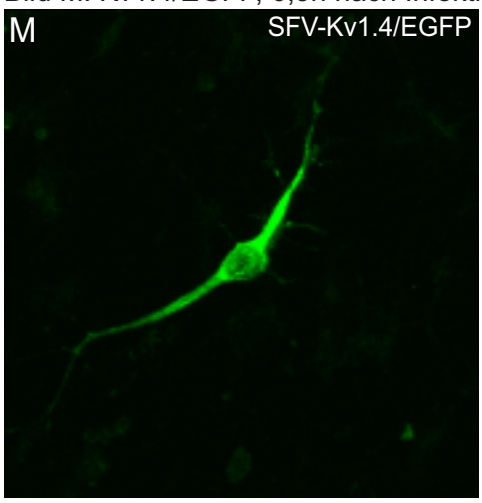
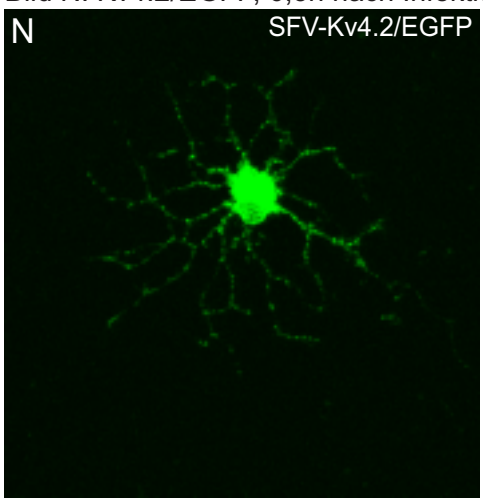


Bild N: Kv4.2/EGFP, 6,5h nach Infektion



Die Neuronenkulturen wurden 4,5 oder 6,5h nach der Infektion fixiert und direkt fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

die zellspezifischen Kompartimente nur aufgrund der Zellmorphologie eindeutig zu identifizieren. Deshalb wurden mit Hilfe der Immunhistochemie (siehe 3.5.) die heterolog exprimierten Proteine zusammen mit kompartimentspezifischen Proteinen nachgewiesen (siehe 4.9.). Dadurch sollte die Verteilung der heterolog exprimierten Proteine in Abhängigkeit zur vorherrschenden Zellpolarität im Neuron analysiert werden.

4.8. Zellpolarität der primärkultivierten hippocampalen Neuronen

Als Tag 0 der Kultivierung wird das Ausplattieren der aus dem Gewebe dissoziierten Neuronen bezeichnet. Zu diesem Zeitpunkt besitzen sämtliche Zellen eine abgeflachte und runde Morphologie. Innerhalb der nächsten zwei Tage wachsen aus dem an Volumen zunehmenden Zellkörper eine Reihe von kurzen Ausläufern, sogenannte Neuriten. Bis zum Tag 4 in Kultur kommt es zur Polarisierung des Wachstums in einem der Neuriten, erkennbar anhand eines größeren Wachstumskegels und deutlich schnellerer Prolongation des Ausläufers. Dieser neuronale Ausläufer besitzt alle Fähigkeiten sich zu einem Axon auszubilden, während die kürzeren, aber in der Regel deutlich dickeren Ausläufer, beginnen dendritische Merkmale auszubilden (Craig und Banker, 1994). Im Verlauf der folgenden Tage in Kultur kommt es dann zur Stabilisierung der ausgebildeten Zellpolarität. Die Mechanismen, die zu der Polarisierung der Neuronen führen sind nur teilweise bekannt, jedoch wird allgemein angenommen, daß extrazelluläre Signale durch den Kontakt zu anderen Zellen oder aber zur umgebenden Matrix eine wichtige Rolle dabei spielen. Ebenfalls unbekannt ist in wie weit die Polarisierung der Neuronen in Kultur vergleichbar ist mit der Polarisierung unter den Bedingungen *in vivo*. Zumindest verfügen Neuronen über einen intrinsischen Mechanismus der zumindest zu einer morphologischen Polarisierung führt. So kann ein Neuron nach der Abtrennung eines sich initial ausbildenden Axons, bei Zellen bis zum 4. Tag in Kultur, aus einem anderen Neuriten ein neues Axon bilden (Bradke und Dotti, 1997).

Zur Charakterisierung der in den verwendeten primärkultivierten hippocampalen Neuronen vorherrschenden Zellpolarität wurden Kulturen unterschiedlichen Alters mit Hilfe der Immunhistochemie in Bezug auf die Verteilung ihrer kompartimentspezifischen Proteine hin untersucht. Zur Lokalisation der dendritischen Komparitmente wurde dabei ein gegen das MAP2 (**M**ikrotubuli **a**ssoziiertes **P**rotein-**2**; Fa. Boehringer Mannheim) gerichteter Antikörper und zur Lokalisation der axonalen Kompartimente die gegen das tau-Protein

(ebenfalls ein Mikrotubuli assoziiertes Protein, Fa. Dako) oder gegen das NfH (**N**euro**f**ilament **H**, Fa. Serotec) gerichteten Antiköper verwendet. Die Antikörper gegen die Mikrotubuli assoziierten Proteine zeigen keine Kreuzreaktivität (siehe Produktinformation).

In jungen Kulturen (etwa bis zum 4. Tag in Kultur) wurde das MAP2 in sämtlichen Zellkompartimenten der Neuronen nachgewiesen (Bild O), während es in den übrigen in der Kultur vorkommenden Zelltypen (Gliazellen und Fibroblasten) nicht lokalisiert wurde. Die Umverteilung der MAP-2 geschieht bei der Entwicklung der dendritischen Kompartimente (Carceres et al.; 1986), dieses passiert in den verwendeten Kulturen zwischen dem 6. und 10. Tag in Kultur. Sowohl das tau-Protein als auch das NfH wurden in den jungen Kulturen gar nicht oder nur sehr schwach nachgewiesen (Bild P). Etwa ab dem 6. Tag in Kultur wurden die spezifisch axonalen Marker eindeutiger nachgewiesen. Dabei wird NfH im Gegensatz zum MAP-2 zuerst in den distalen Bereichen einzelner Ausläufer (Wachstumskegel) oder aber lokal in spezifischen Verdickungen der Axone (Boutons) lokalisiert (Bild P). Dagegen zeigt das tau-Protein anfänglich noch in einigen Bereichen der Zelle (leichte Hintergrundfärbung auch im Zellkörper) Überlagerungen mit dem MAP-2. Offensichtlich wird die Polarisierung der Axone am distalen Bereich induziert, vermutlich durch Ausbildung synaptischer Strukturen. Spätestens ab dem 14. Tag in Kultur war die Polarisierung der Neurone stabilisiert und die Trennung in axonale und dendritische Kompartimente vollzogen. In den Übersichtaufnahmen (Bilder Q1 und Q2, Q1b und Q2b stellen die zugehörigen Durchlichtaufnahmen dar) läßt sich ein ausgeprägtes Netzwerk von Dendriten und Axonen erkennen. Bei näherer Betrachtung einzelner Neurone (Bilder R1 bis R3b) lassen sich zwar die vom Zellköper ausgehenden dendritschen Kompartimente einem einzelnen Neuron zuordnen (R1, R2a und R3a), jedoch die zugehörigen axonalen Kompartimente nur sehr schlecht bis gar nicht (Cy3-Aufnahmen in den Bildern R2b und R3b). Während NfH auch zu diesem Zeitpunkt nicht in proximalen Ausläufern lokalisiert wurde, konnten zumindest einzelne tau-posive Ausläufer einem Neuron zugeordnet werden, obwohl auch dieses aufgrund der sehr starken Vernetzung der Axone schwierig war.

In den verwendeten Kulturen wurden allerdings immer nur für einen Teil der vitalen Neuronen (siehe 3.3.6.) die Polarisierung in axonale und dendritische Kompartimente nachgewiesen (beachte nicht markierte Neuronen im Bild R1).

Zellpolarität der hippocampalen Primärkultur:

Bild O: 4. Tag in Kultur

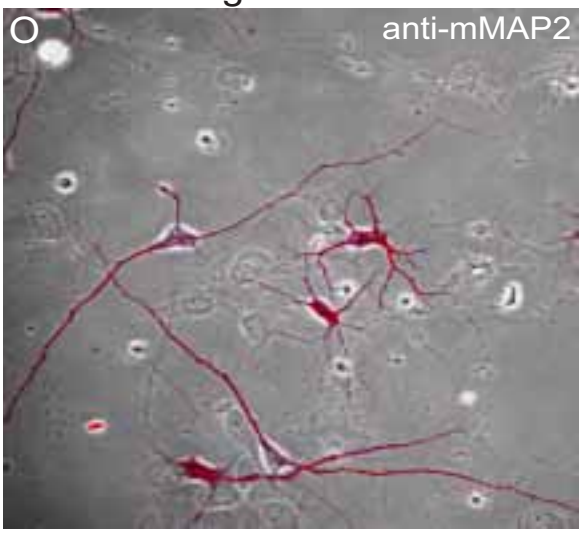


Bild P: 8. Tag in Kultur

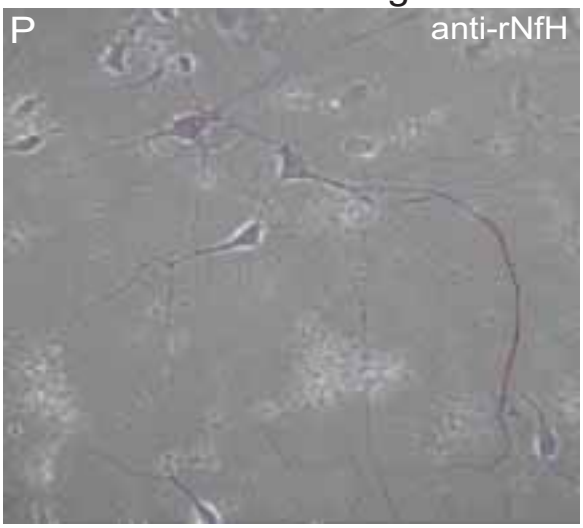


Bild Q1: 15. Tag in Kultur

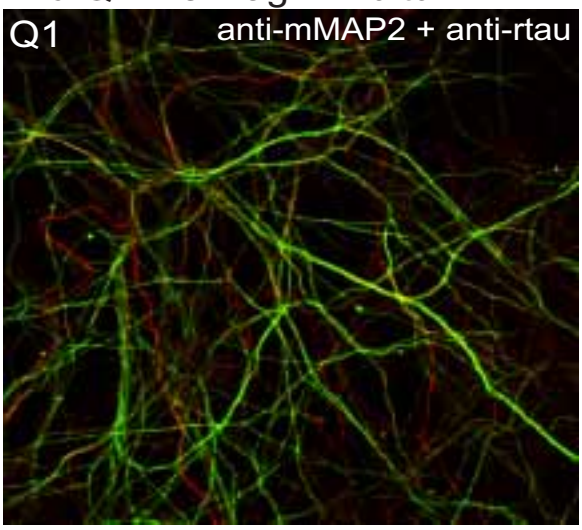


Bild Q1b: 15. Tag in Kultur

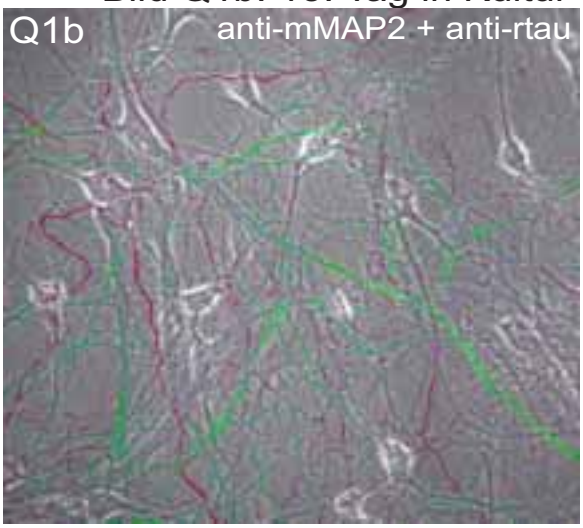


Bild Q2: 12. Tag in Kultur

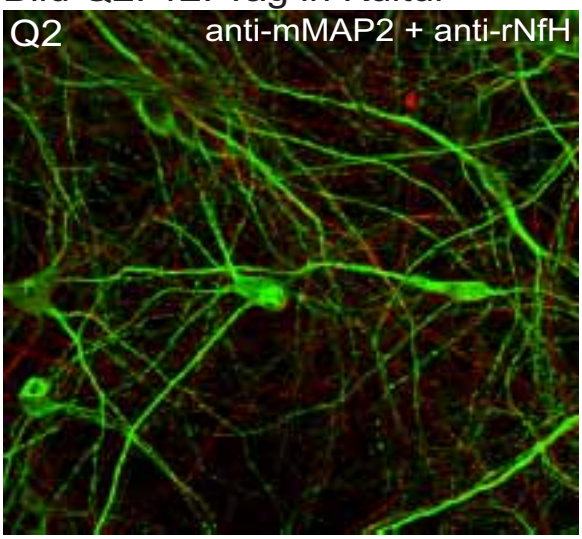
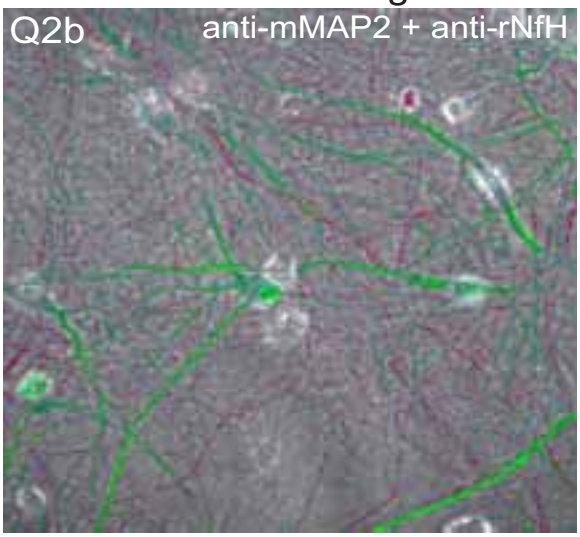


Bild Q2b: 12. Tag in Kultur



rote Fluoreszenzsignale durch mit Cy3 konjugierte anti-rIgG oder anti-mIgG und grüne Fluoreszenzsignale durch mit Cy2 konjugierten anti-mIgG Zweitantikörper

Zellpolarität der hippocampalen Primärkultur:

Bild R1: 15. Tag in Kultur

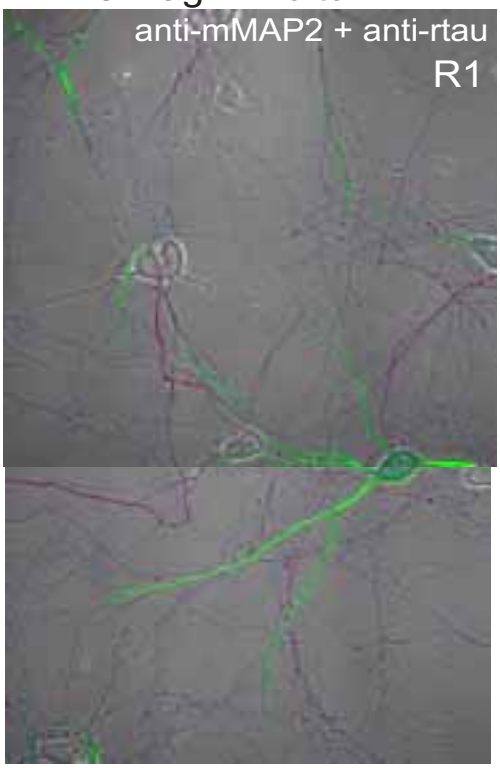


Bild R2a: 15. Tag in Kultur

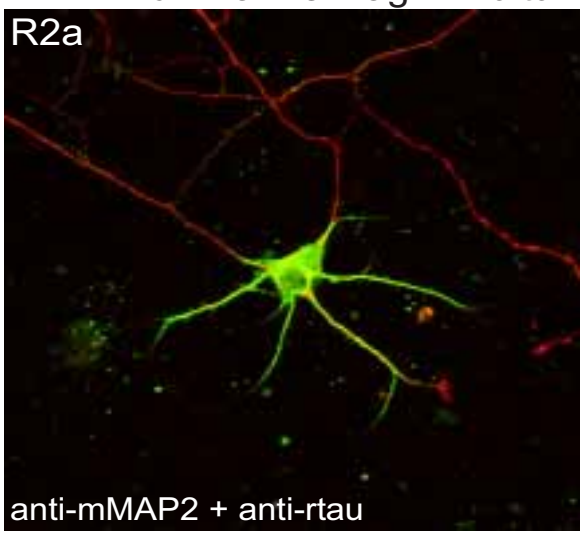


Bild R2b: 15. Tag in Kultur

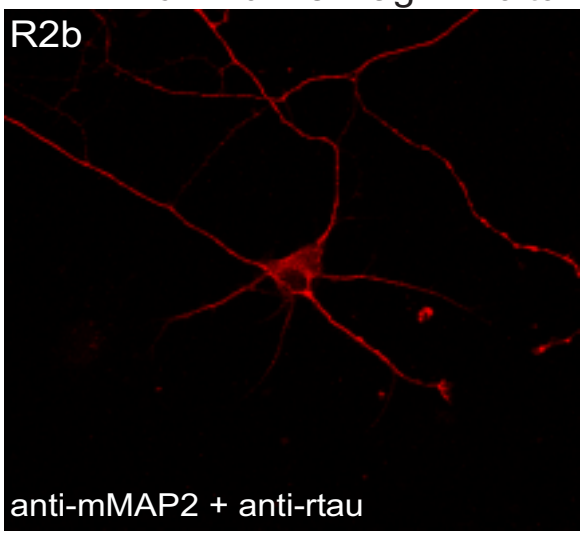


Bild R3a: 14. Tag in Kultur

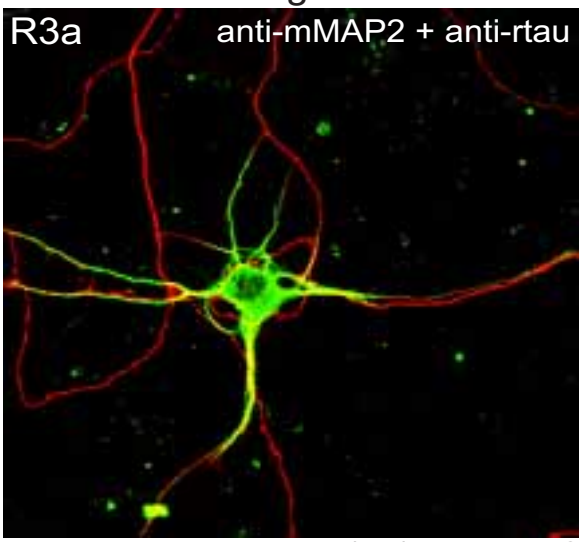
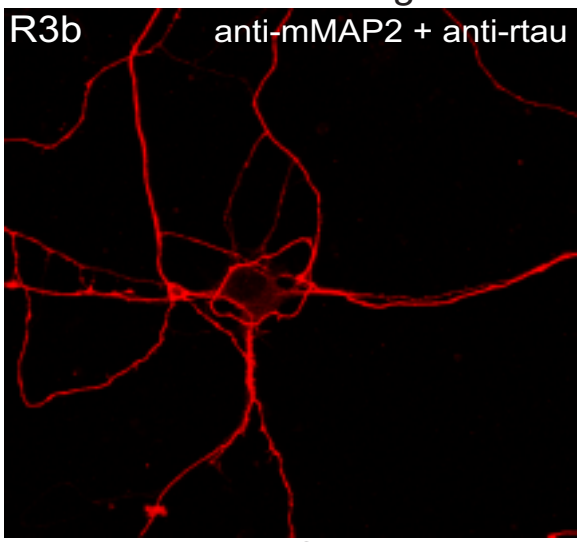


Bild R3b: 14. Tag in Kultur



rote Fluoreszenzsignale (tau) durch mit Cy3 konjugierte anti-rIgG und grüne Fluoreszenzsignale (MAP2) mit Cy2 konjugierten anti-mIgG Zweitantikörper

4.9. Lokalisation der viral exprimierten Proteine zusammen mit zellspezifischen Proteinen

Primäre hippocampale Neuronenkulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung (nach 4, 8 und 14 Tagen in Kultur) mit rekombinanten Semliki Forest Viren infiziert, die für die verschiedenen Kv1.4 α- und Kv4.2 α-Konstrukte (CD4-Chimären oder mit EGFP markiert) oder aber für das EGFP kodierten. Nach einer Infektionszeit von etwa 6,5 h wurden die Zellen fixiert und immunhistochemisch untersucht (siehe 3.3.5.). Dabei wurden die heterolog exprimierten Proteine zusammen mit den endogenen Markerproteinen, die in dendritenspezifischen (MAP2) oder axonspezifischen (tau oder NfH) Zellkompartimenten lokalisiert sind, nachgewiesen.

Die Infektion mit SFV-EGFP und die Doppelmarkierung der heterolog exprimierten Proteine und der endogenen tau-Proteine ermöglichte nun die Zuordnung der zu einem Neuron gehörigen axonalen Strukturen. Selbst innerhalb eines stark verzweigten axonalen Netzwerkes wurde der Verlauf und die Kontaktstelle mit anderen Neuronen anhand der Überlappung beider Proteine identifiziert (Bilder S1a bis S2b).

Die gegensätzliche intrazelluläre Verteilung der beiden Kv1.4 und Kv4.2 α-Proteine *in vivo* sollte, im Falle eines gerichteten Proteintransportes, durch Überlappung der heterologen Kv1.4 α-Proteine mit den axonalen und der Kv4.2 α-Proteine mit den dendritischen Markerproteinen nachweisbar sein.

Die heterologe Genexpression der unterschiedlichen Kv-Konstrukte zeigte jedoch in der Regel keine unterschiedliche Verteilung der α-Proteine (Bilder T bis U2). Während die Überlagerung von CD4Kv1.4ct mit dem axonalen Markerprotein tau in Bild T als gerichteter Proteintransport interpretiert werden kann, zeigt der Vergleich zu den heterolog exprimierten Kv4.2-Konstrukten (Kv4.2/EGFP in Bild V und CD4Kv4.2$_{ct}$ in Bild U1) dieselbe Verteilung. In Einzelfällen wurden auch für das CD4Kv4.2ct-Protein Expressionsmuster nachgewiesen, die einen gerichteten Proteintransport vermuten ließen. So ist in Bild U2 das chimäre Protein nur im neuronalen Zellkörper lokalisiert, was vermutlich aber auf eine unvollständige Morphologie oder Polarisierung der infizierten Neuronen zurückzuführen ist. Die ungerichtete Verteilung der heterologen Kv-α-Konstrukte war unabhängig vom Alter der infizierten Neuronenkultur, wobei allerdings festgestellt wurde, daß die Infektionsausbeuten in älteren Kulturen deutlich schlechter wurden. Ebenfalls wurde eine Abhängigkeit der Infektionsausbeuten zur Behandlung mit Ara-C (siehe 3.3.5.) festgestellt, da in unbehandelten Kulturen deutlich mehr infizierte Neuronen nachgewiesen

wurden, während mit Ara-C behandelte Kulturen selbst nach mehrfachen Mediumwechsel deutlich schlechter infiziert wurden.

Überlappung von heterogen exprimiertem EGFP und endogenem tau:

Bild S1a: EGFP + tau, 4,5h nach Infektion

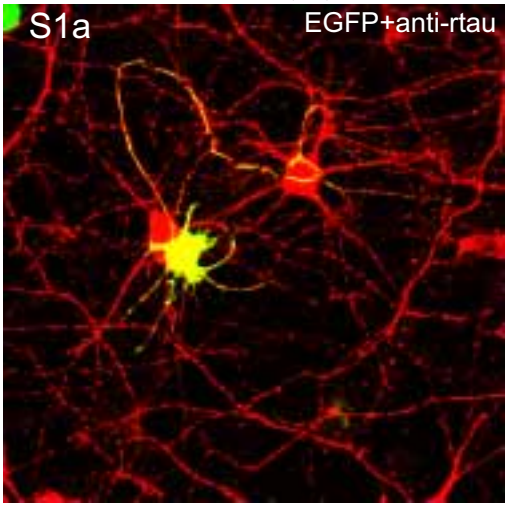


Bild S1b: FITC-Filter allein

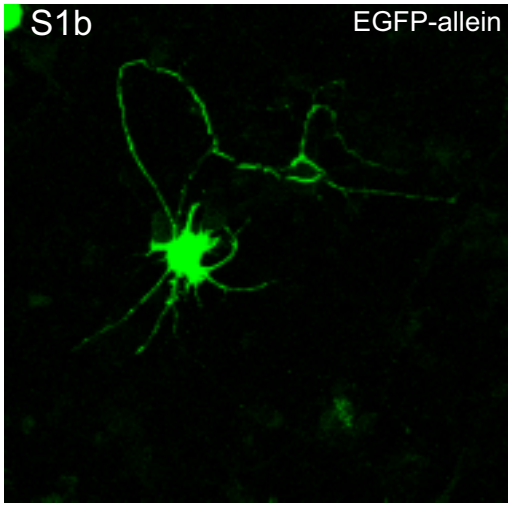


Bild S2b: EGFP + tau, 6,5h nach Infektion

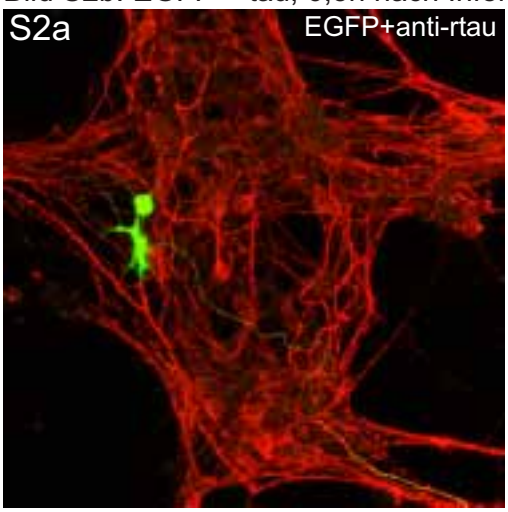
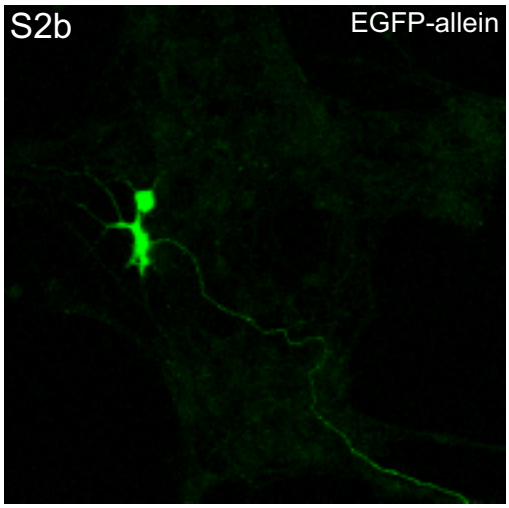


Bild S1b: FITC-Filter allein



rote Fluoreszenzsignale (tau) durch mit Cy3 konjugierte anti-rIgG Zweitantikörper und grüne Fluoreszenzsignale durch EGFP-Fluoreszenz

Lokalisation viral exprimierter und zellspezifischer Proteine:

Bild T: CD4Kv1.4ct + anti-rtau,
6h nach Infektion

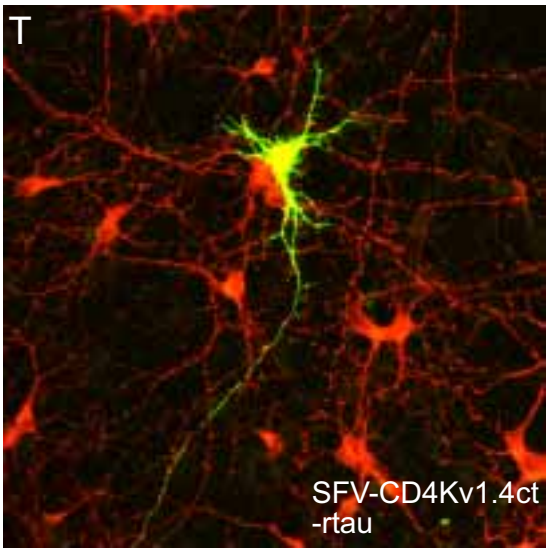


Bild V: Kv4.2/EGFP + anti-rtau,
5,5h nach Infektion

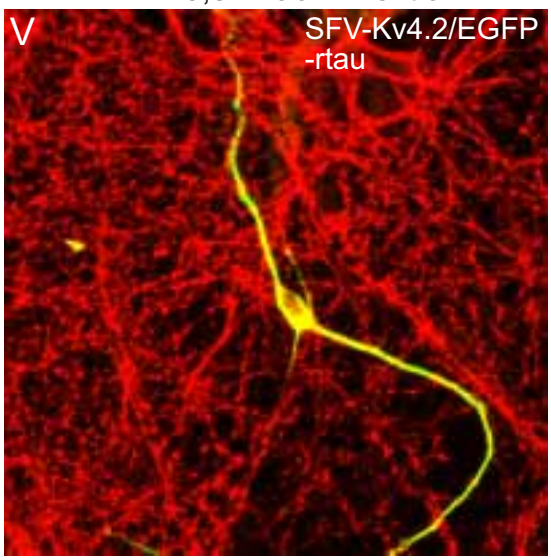


Bild U1: CD4Kv4.2ct + anti-rtau,
6h nach Infektion

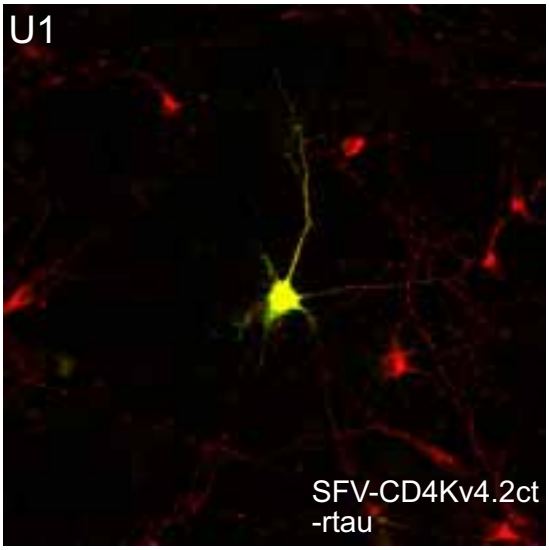
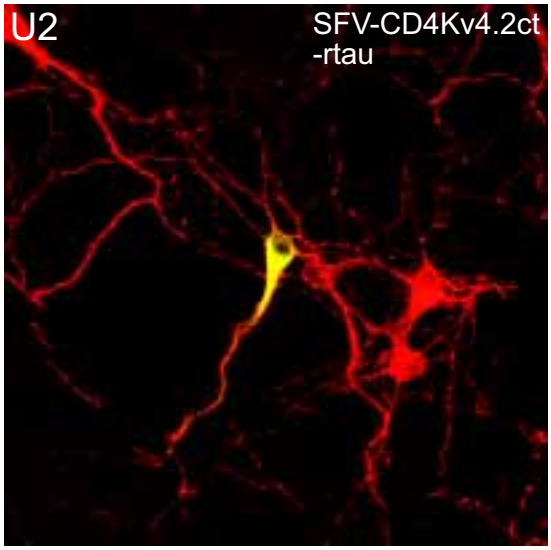


Bild U2: CD4Kv4.2ct +anti-rtau,
6h nach Infektion nur im Soma



rote Fluoreszenzsignale (tau) durch mit Cy3 konjugierte anti-rIgG und grüne Fluoreszenzsignale durch EGFP-Fluoreszenz oder für CD4-Konstrukte mit Cy2 konjugierte anti-mIgG (CD4) Zweitantikörper

5. Diskussion

K^+-Ströme sind die ersten spannungsabhängigen Ionenströme, die während der Entwicklung in Neuronen gemessen werden (Spitzer, 1991). Dabei lassen sich eine Reihe von unterschiedlichen aber physiologisch definierten K^+-Strömen zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung und in den verschiedenen Neuronentypen messen. Entsprechend werden für die verschiedenen Kv α-Proteine entwicklungs- und zelltypspezifische Expressionsmuster nachgewiesen (Beckh und Pongs, 1990; Sheng et al., 1992; Maletic-Savatic et al., 1995; Veh et al., 1995). Zusätzlich zu dieser transkriptionell regulierten Expression der Kv α-Proteine wird in Neuronen eine kompartimentspezifische Verteilung bestimmter Kv α-Proteine gefunden. Beispielsweise werden in den Pyramidalzellen des Hippocampus die Kv4.2 α-Proteine in den somatodendritischen, und die Kv1.4 α-Proteine in den axonalen sowie den präsynatptischen Zellbereichen lokalisiert (siehe 1.1.), was impliziert, daß diese Kanal α-Untereinheiten gerichtet transportiert werden müssen.
Die Mechanismen dieses gerichteten Proteintransportes sind nicht bekannt.

Es ist jedoch anzunehmen, daß im Trans-Golgi-Netzwerk intrinsische Proteinsignale erkannt werden, die für die Sortierung in spezifische Transportvesikel verantwortlich sind. Da die gegensätzlich transportierten Kv1.4 und Kv4.2 α-Proteine funktional ähnliche Kv-Kanäle bilden, und sich in ihren Strukturen nur im Bereich der zytoplasmatisch orientierten Enden unterscheiden, stellen sie ein geeignetes Paar zur Analyse des gerichteten Proteintransportes dar. Im MDCK-Modell deutet das Transportverhalten verschiedener Kv α-Proteine auf die Existenz von transportbestimmenden Proteindomänen im carboxyterminalen, zytoplasmatischen Bereich hin (Kv1.4: La Maout, et al., 1996; Kv2.1: Scannevin et al., 1996). Da jedoch die Orientierungen des gerichteten Proteintransportes in polaren Epithelzellen nicht immer den komplementären Lokalisationen im Neuron entsprechen, ist es fraglich, ob sich die Ergebnisse aus dem MDCK-Modell auf die Bedingungen *in vivo* übertragen lassen (Jareb und Banker, 1998).

5.1. Neuronales Expressionssystem

Zum besseren Verständnis des gerichteten Proteintransportes der Kv1.4 und Kv4.2 α-Untereinheiten im Neuron war es deshalb notwendig ein neuronales Expressionssystem zu etablieren. Dieses sollte mit den Bedingungen *in vivo* vergleichbar sein, und den spezifischen Nachweis von heterolog exprimierten Proteinen in Abhängigkeit zu ihrer kompartimentspezifischen Verteilung ermöglichen.
Die verschiedenen Komponenten eines derartigen Systems umfassen die *neuronalen Zellen*, in denen durch die *Methode des Gentransfers* Proteine heterolog exprimiert werden, sowie die *Nachweismethode*, mit der die heterolog exprimierten Proteine in Bezug auf ihre zelluläre Verteilung lokalisiert werden können. Für jede dieser Komponenten besteht die Wahl zwischen verschiedenen etablierten Methoden:

- neuronale Zelle:
  - neuronale Zellinie (z.B. PC12, NT2)
  - primärkultivierte Neuronen aus dem peripheren oder zentralen Nervensystem
  - organotypische Slicekultur

- Methode des Gentransfers:
  - chemische Transfektion (z.B. Kalziumphosphat-Methode, Lipide)
  - mechanische Transfektion (z.B. Mikroinjektion, Goldpartikelbeschuß)
  - Virusinfektion

- Nachweismethode:
  - indirekter Proteinnachweis (Immunhistochemie)
  - direkter Proteinnachweis (GFP-Fluoreszenz)

Bei der Wahl der zu verwendenden neuronalen Zellen muß neben dem Aspekt der Zellpolarität (siehe 4.8.), die eine Grundvoraussetzung für den gerichteten Proteintransport darstellt, auch die Handhabbarkeit der Zellen sowie die Durchführbarkeit des Gentransfers und des Proteinnachweises berücksichtigt werden. So entsprechen Neuronen in organotypischen Slicekulturen am ehesten den Bedingungen *in vivo*, da sie eingebettet in das sie umgebende, native Gewebe kultiviert werden, dafür aber sind die Methoden des Gentransfers und des Proteinnachweises nur sehr schwer durchzuführen. Im Gegensatz dazu läßt sich der Gentransfer mit relativ geringem Aufwand in neuronalen Zellinien

durchführen, die allerdings in Bezug auf ihre Zellpolarität nicht unbedingt mit den Neuronen *in vivo* zu vergleichen sind. In dieser Arbeit wurden deshalb primärkultivierte Zellen aus dem peripheren (SCG-Neurone, siehe 3.3.4. und 4.7.2.) und dem zentralen Nervensystem (Hippocampus, siehe 3.3.3. und 4.8.) verwendet.

Für die Methode des Gentransfers wurden verschiedene Methoden der chemischen und mechanischen Transfektion sowie die Virusinfektion getestet. Dabei führten die Standardmethoden des Gentransfers, die chemischen Transfektionen nach der Kalziumposphat-Methode oder mit Lipid-Reagentien (DOTAP, LIPOFECTIN und DMRIE-C), in Bezug auf Reproduzierbarkeit und Ausbeute (0,01%) zu keinem brauchbaren Resultat (siehe 4.7.1.). Dieses liegt in der Natur der Neuronen, die als hochdifferenzierte und postmitotische Zellen zwar zellspezifische Funktionen ausüben (Ausbildung von Axon und Dendriten), jedoch nicht mehr in der Lage sind sich zu teilen, da ihr Zellzyklus auf der Stufe der G_1-Phase (bei Neuronen entsprechend G_0-Phase genannt) arretiert ist. Dadurch finden bestimmte Zellprozesse wie beispielsweise die Endocytose, die bei der chemischen Transfektion zur Aufnahme der Nukleinsäuren führt, im Vergleich zu prämitotischen Zellen nur noch in sehr eingeschränktem Maße statt (Lindl und Bauer, 1989).

Als Methode eines mechanischen Gentransfers wurde die Mikroinjektion von cDNA oder cRNA angewendet. Dabei konnten aufgrund der Größenverhältnisse zwischen Injektionsnadel und Neuron nur SCG-Neurone aus dem peripheren Nervensystem verwendet werden (siehe 4.7.2.). Diese Methode des Gentransfers führte zwar in den verwendeten Zellen in Bezug auf Reproduzierbarkeit und Ausbeute zu brauchbaren Ergebnissen, jedoch ließ sich kein gerichteter Proteintransport der heterolog exprimierten Proteine nachweisen. Ursache dafür könnte die geringe Zellpolarität dieser Neurone sein, die sich auch nicht durch die Applikation von Matrixproteinen (siehe 3.3.2.2.) oder anderen Faktoren (siehe 2.2. Medienzusätze) beeinflussen ließ. Ein weiterer Nachteil dieser Methode war der enorme Zeitaufwand, der eine zeitgleiche Durchmusterung einer Serie von verschiedenen Expressionskonstrukten unmöglich machte. Eine alternative Methode des mechanischen Gentransfers stellt die Transfektion durch Beschuß mit DNA beladenen Goldpartikeln dar, wie es in der Pflanzenmolekularbiologie standardmäßig durchgeführt wird. Mit dieser Methode können auch Neuronen höherer Zellpolarität, wie primärkultivierte Neurone aus dem Hippocampus, transfiziert werden, allerdings unterliegen derartig transfizierte Zellkulturen einer enormen mechanischen Beanspruchung (Biewenga et al., 1997). So zeigten schon die Methoden der chemischen Transfektion und die Mikroinjektion, daß die

Kulturen äußerst empfindlich auf Temperatur- und pH-Schwankungen sowie mechanischen Streß reagieren.
Eine alternative Methode stellt der durch Viren induzierte Gentransfer dar. Die Verwendung von neuropathogenen Viren unterliegt jedoch besonderen Sicherheitsbestimmungen. Mit Rücksicht auf die vorherrschenden S1-Bedingungen wurde eine Variante des Semliki-Forest-Virus verwendet (siehe 4.7.3.). Dabei wurden rekombinante und replikationsdefiziente Viren erzeugt, die nicht in der Lage waren, selbst bei Rekombination des viralen Genoms, mehr als einen Infektionszyklus zu durchlaufen. In das Genom dieser Virusvarinate wurden unterschiedliche Konstrukte der Kv1.4 und Kv4.2 α-Untereinheiten kloniert, und anschließend primärkultivierte Neuronen damit infiziert. Die heterolog exprimierten α-Proteinkonstrukte ließen jedoch trotz der vorherrschenden Zellpolarität der infizierten Neurone keinen gerichteten Proteintransport erkennen (siehe 4.9.). Ursache dafür könnten entweder die Überladung des endoplasmatischen Retikulums (ER-Überladung), oder aber eine für den Proteintransport von Kv α-Proteinen noch nicht ausreichende Zellpolarisierung der verwendeten Neuronen sein (siehe 5.4.).
Die Wahl der Nachweismethode war abhängig von den zur Infektion eingesetzten Konstrukten. Dabei bewies sich die Methode des direkten Proteinnachweises als vorteilhafter, da sie nicht nur zeitsparender, sondern ganz offensichtlich für die infizierten Kulturen auch schonender war (siehe 4.7.3.2.).

5.2. Kv-Konstrukte für den direkten Proteinnachweis

In den Konstrukten Kv1.4/EGFP und Kv4.2/EGFP wurde die cDNA des *verstärkt grün fluoreszierenden Proteins* (EGFP) so in die Leserahmen der Kv1.4 und Kv4.2 α-cDNAs kloniert, daß in den abgeleiteten Proteinen das EGFP an das carboxyterminale Ende der Kv α-Untereinheiten fusioniert war (siehe 4.2, Abbildung 6). Aufgrund der EGFP-Fluoreszenz konnten die heterolog exprimierten Fusionsproteine direkt mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie (siehe 3.6.) nachgewiesen werden. Durch heterologe Genexpression in Gewebekulturzellen (siehe 4.3.1.) wurde gezeigt, daß die zellulären Verteilungen der Kv/EGFP-Konstrukte (Bilder B, C und F) und der entsprechenden Wildtypproteine (Bilder D und E) vergleichbar sind. Im Gegensatz zum EGFP (Bild A) zeigten die heterolog exprimierten Kv1.4/EGFP- und Kv4.2/EGFP-Konstrukte eine Lokalisation in den inneren Membranen der Zellen, welches einen Einbau in die Membranen des

endoplasmatischen Retikulums andeutet. Die starke Markierung des kernnahen endoplasmatischen Retikulums deutet auf eine ER-Überladung hin. Diese Überladung ist auf den starken viralen Promoter (pCMV-Promoter in den Expressionsvektoren pcDNA3.1) zurückzuführen, der die Transkription der transfizierten Konstrukte reguliert. Die ER-Überladung versetzt die transfizierten Zellen vermutlich in einen Streßzustand, der durch Anschalten einer Signalkaskade (über NF-κB) eine zelluläre Abwehr hervorruft, die über die Synthese von Streßproteinen bis hin zur Apoptose reichen kann (Baeuerle und Baltimore, 1996; Pahl und Baeuerle, 1997). Im Vergleich zu den Kv1.4-Konstrukten wurden bei der Expression der Kv4.2-Konstruke deutlich mehr morphologisch deformierte und tote Zellen beobachtet. Möglicherweise ist dieses auf einen zytotoxischen Effekt des Kv4.2-Proteins zurückzuführen.

Die elektrophysiologische Charakterisierung der Kv1.4/EGFP und Kv4.2/EGFP exprimierenden Zellen zeigte, daß die Markierung mit EGFP keinen Einfluß auf die Bildung von funktionalen K^+-Kanälen nimmt (siehe 4.3.2., Abbildung 10). Die kinetischen Eigenschaften, die aus den gemessenen makroskopischen K^+-Strömen abgeleitetet wurden, sind mit denen der durch die Wildtypproteine gebildeten K^+-Kanäle vergleichbar. Allein die Erholungsphase der Kanäle aus dem inaktivierten Zustand scheint sich durch die Markierung mit EGFP zu verlängert.

Die Maskierung des carboxyterminalen Endes durch die Fusion mit EGFP könnte dagegen einen Einfluß auf das Transportverhalten ausüben. So zeigten heterolog exprimierte Kv1.4/EGFP-Konstrukte keine Wechselwirkung mit dem PSD-95 Protein. Obwohl der Membraneinbau beider Proteine unabhängig voneinander geschieht, und es nicht bekannt ist, welchen Einfluß diese Wechselwirkung auf den Proteintransport *in vivo* besitzt, können die Kv1.4/EGFP-Konstrukte zumindest nicht am Ort ihrer Funktion über PSD-95 am Zytoskelett fixiert werden. Um den potentiell negativen Einfluß einer carboxyterminalen Maskierung durch das EGFP oder einen passiven Proteintransport durch die Wechselwirkung mit endogenen Kv α-Proteinen auszuschließen, wurden alternative Konstrukte der Kv1.4 und Kv4.2 α-Untereinheiten konstruiert, die jedoch nur durch die Methode des indirekten Proteinnachweises detektiert werden konnten.

5.3. Kv-Konstrukte für den indirekten Proteinnachweis

In den chimären Konstrukten $CD4_{(ex+tm)}/Kv1.4_{ct}$ und $CD4_{(ex+tm)}/Kv4.2_{ct}$ ist der zytoplasmatisch orientierte C-Terminus der Kv α-Proteine an die extrazelluläre und membrandurchspannende Domäne des CD4-Rezeptorproteins kloniert worden (siehe 4.4., Abbildung 13). Diese Konstrukte sind nicht in der Lage mit endogenen Kv α-Proteinen in Wechselwirkung zu treten. Im MDCK-Modell wurde das $CD4_{(ex+tm)}/Kv1.4_{ct}$-Konstrukt in gleicher Orientierung wie das Kv1.4 α-Protein transportiert, während das Kontrollkonstrukt $CD4_{stop}$ (nur die extrazelluläre und membrandurchspannende Domäne des CD4-Rezeptorproteins werden exprimiert, Abbildung 15) keinen gerichteten Proteintransport zeigte (persönliche Mitteilung von Dr. J. Merot). Auch in Bezug auf die Wechselwirkung mit dem PSD-95-Protein zeigte das $CD4_{(ex+tm)}/Kv1.4_{ct}$-Konstrukt im Gegensatz zu den $CD4_{(ex+tm)}/Kv4.2_{ct}$- und $CD4_{stop}$- oder aber den Kv1.4/EGFP-Konstrukten die spezifische Funktionalität des Kv1.4 α-Proteins (siehe 4.5., Bilder I und J). Da sowohl in den Gewebekulturzellen, als auch in den verwendeten primärkultivierten Neuronen endogen keine CD4-Rezeptorproteine nachgewiesen wurden, konnten die entsprechenden chimären CD4-Konstrukte nach der heterologen Genexpression indirekt durch immunologische Markierung der Proteine mit einem spezifischen Erstantikörper (anti-CD4-Antikörper) und fluoreszierendem Zweitantikörper (Cy2 oder Cy3 gekoppelte anti-IgG-Antikörper) nachgewiesen werden.

5.4. Gerichteter Proteintransport nach viraler Expression

Mit Hilfe der beschriebenen SFV-Variante wurden primärkultivierte Neurone des Hippocampus mit den EGFP markierten Konstrukten Kv1.4/EGFP und Kv4.2/EGFP sowie den Fusionskonstrukten $CD4_{(ex+tm)}/Kv1.4_{ct}$ und $CD4_{(ex+tm)}/Kv4.2_{ct}$ infiziert (siehe 4.7.). Obwohl für die Neurone in den verwendeten Kulturen die Polarisierung in die neuronspezifischen Zellkompartimente gezeigt wurde (siehe 4.9., Bilder O bis R3b), konnte für die heterolog exprimierten Proteine kein gerichteter Proteintransport nachgewiesen werden. Die Infizierbarkeit der Neurone wurde dabei mit zunehmender Polarisierung (gleichbedeutend mit dem Alter der Kultur) schwieriger. Durch gleichzeitigen Nachweis der heterolog exprimierten und endogenen kompartimentspezifischen Proteine wurden die vorherrschenden Zellpolaritäten zwischen infizierten und nicht

infizierten Neuronen innerhalb einer Kultur verglichen. Dabei zeigte sich, daß entweder vorwiegend Neurone mit geringerer Polarisierung infiziert worden waren, oder aber die Morphologie der infizierten Neurone durch die Bedingungen der Infektion und Immunhistochemie weitestgehend zerstört wurde.

Beim Vergleich der Infektionsausbeuten, die bei einem direkten Proteinnachweis (Nachweis der EGFP-Fluoreszenz ohne immunhistochemische Behandlung) oder aber bei einem indirekten Proteinnachweis (EGFP-Fluoreszenz nach immunhistochemischer Behandlung) erzielt wurden, wurde ein Verlust von etwa 50% an infizierten Neuronen nach imunhistochemischer Behandlung festgestellt. Vermutlich wird durch die immunhistochemische Behandlung die Morphologie der ohnehin schon durch die Infektion in Mitleidenschaft gezogenen Neurone so angegriffen (Abreißen der feinen axonalen Strukturen wurde sehr häufig beobachtet), daß die Neurone eine scheinbar geringere Polarisierung aufweisen. Alternative Bedingungen für die Kultivierung (Einbettung in unterschiedliche Matrixproteine oder Applikation von verschiedenen Faktoren), Infektion und immunhistochemische Behandlung wurden getestet, führten jedoch zu keinem anderen Ergebnis.

Bei sämtlichen durch die Viren induzierten Expressionen wurden die heterolog exprimierten Proteine mit besonders hoher Intensität im Bereich des kernnahen Somas nachgewiesen. Die Verteilung der heterologen Proteine in den vom kernnahen Soma strahlenförmig auslaufenden übrigen Bereichen der Zelle war gleichmäßig, wobei die Intensitäten in etwa proportional zum Durchmesser der Ausläufer waren. Die hohe Dominanz im kernnahen Bereich spiegelt die ER-Überladung wider, die wiederum durch den sehr starken viralen Promoter (subgenomischer 26s-Promoter) verursacht wird (siehe 4.7.3.2.).

Die ER-Überladung könnte begründen, daß kein gerichteter Proteintransport für die heterolog exprimierten Proteine beobachtet werden kann. Da die Membranen des endoplasmatischen Retikulums bis in die dünnen Enden der neuronalen Ausläufer hineinreichen (Berridge, 1998), könnte eine ER-Überladung dazu führen, daß der Anteil an gerichtet transportierten Proteinen durch den überschüssig produzierten Anteil, der ungerichtet in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums diffundiert, überdeckt wird. Aus diesem Grunde wurde versucht, durch Variation der Infektionszeiten oder aber Blockierung der Proteinsynthese durch Applikation von Cycloheximid, ein Zeitfenster zu identifizieren, in dem die initial synthetisierte Menge an heterologen Protein noch gerichtet transportiert wird. Dieses führte jedoch zu keinem Ergebnis. Unter Umständen läßt sich

das darauf zurückführen, daß die Menge an gerichtet transportierten Proteinen innerhalb eines infizierten Neurons so gering ist, daß die Nachweisgrenze (direkt und indirekter Proteinnachweis) nicht erreicht wird.

Eine alternative Erklärung für die ungerichtete Verteilung der heterolog exprimierten Proteine könnte eine zu geringe Polarisierung der Neurone sein. Untersuchungen der Polarisierung von primärkultivierten Neuronen zeigen, daß die Fähigkeit zur Differenzierung in axonale und dendritische Kompartimente durch zellinterne Mechanismen geschieht (Bradke und Dotti, 1997). Nach dem Aussäen der dissoziierten Neurone wachsen radial aus dem Soma Neuriten, die zunächst keine Polarisierung aufweisen. Erst nach einigen Tagen kommt es zur Polarisierung des Zellwachstums in einem der Ausläufer. Dieser wächst nun im Vergleich zu den restlichen Neuriten wesentlich schneller, und entwickelt sich im Endeffekt zu einem Axon. Die Polarisierung des Zellwachstums wird vermutlich zufällig aufgrund von extrazellulären Signalen, wie beispielsweise eine lokal erhöhte Konzentration an Matrixproteinen auf den bei der Kultivierung verwendeten und entsprechend beschichteten Deckgläsern, induziert. Ein Indiz dafür ist, daß nach dem Abschneiden eines anfänglich polarisierten Ausläufers ein Axon aus einem alternativen Neurit entstehen kann. Während der Entwicklung des Axons kommt es zunächst zur Polarisierung des Zytoskelettes (Mikrotubuli und Filamente). Es ist möglich, daß diese erste Stufe der Zellpolarisierung noch nicht ausreicht, um Kv α-Proteine gerichtet zu transportieren. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, daß Kv α-Proteine auch erst relativ spät in der Entwicklung exprimiert werden. So werden in primärkultivierten Neuronen des Hippocampus endogene Kv1.4 (nach zehn Tagen) und Kv4.2 α-Proteine (nach sechs Tagen) erst nach einigen Tagen der Kultivierung nachgewiesen (Maletic-Savatic et al., 1995). Zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung lassen sich die endogen exprimierten Kv α-Proteine, im Gegensatz zu den Bedingungen *in vivo*, in einem der neuronalen Zellkompartimente bevorzugt lokalisieren. Dieses kann darauf hindeuten , daß der gerichtete Transport von Kv α-Proteinen zusätzlich induziert werden muß und nicht durch die Natur des Proteins oder des Neurons vorgegeben ist. Beispielsweise könnten durch die Synaptogenese und der damit ablaufenden Verschaltung einer Gruppe von Neuronen extrazelluläre Signale entstehen, die zur Lokalisation der Kv α-Proteine am Ort ihrer Funktion führen. Diese Signale könnten durch den interzellulären Kontakt zwischen Neuroliginen und β-Neurexinen entstehen. Beides sind Membranproteine, die spezifisch in Neuronen exprimiert werden (Missler und Südhof, 1998; Missler et al., 1998). Während die Neuroligine im postsynaptischen Neuron mit PSD-95 in

Wechselwirkung treten können, binden die β-Neurexine im präsynaptischen Neuron das CASK-Protein, das ebenfalls ein Mitglied der PDZ-Proteinfamilie darstellt (Irie et al., 1997; Hata et al. 1996). Ob die Interaktion zwischen Neuroliginen und β-Neurexinen direkt oder indirekt, im Falle des PSD-95 über dessen Palmitylierung (siehe 4.6.), zur Membranlokalisation von Gerüstproteinen wie PSD-95 oder CASK führt, ist unbekannt. Da das CASK-Protein über eine CaM-Kinase-Domäne (Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Proteinkinase) verfügt, könnten auch zelluläre Signalkaskaden angeschaltet werden, um die Synthese von zusätzlichen Proteinfaktoren zu induzieren, die für den gerichteten Transport der Kv α-Proteine benötigt werden.

Vorstellbar ist auch eine physiologisch flexiblere Form des Proteintransportes, wie es für die Kv1.1 und Kv1.2 α-Proteine bei der Myelinisierung und Demyelinisierung eines Axons *in vitro* beobachtet wird. Bei der Myelinisierung kommt es im Bereich zwischen den Ranvierschen Schnürringen und der Myelinscheide, am Ort der terminalen Myelinschleifen (*paranodal membranes*), zu einem interzellulären Kontakt zwischen Axon und myelinisierender Gliazelle. An diesem interzellulären Kontakt ist ein den Neurexinen eng verwandtes Protein, das Paranodin (auch als Caspr (***c****ontactin* ***as****sociated* ***pr****otein*) bezeichnet) beteiligt, welches ein Homologes zu dem Neurexin IV Protein in *Drosophila melanogaster* darstellt (Menegoz et al., 1997; Peles et al., 1997, Peles et al., 1997b). In einem myelinisierten Axon werden in enger Nachbarschaft zum Paranodin, am Übergang zur Myelinscheide, die Kv1.1 und Kv1.2 α-Proteine mit hoher Dichte lokalisiert (Wang et al., 1994; McNamara et al., 1996). Da das Paranodin im Gegensatz zum Neurexin IV keine PDZ-Domäne, sondern eine Proteinbindungsstelle für SH3-Domänen aufweist, werden die Kv1.1 und Kv1.2 α-Proteine vermutlich indirekt über ein Gerüstprotein aus der PDZ-Proteinfamilie in der Nachbarschaft zu Paranodin fixiert (Bellen et al., 1998). Die *in vitro* induzierte Demyelinisierung eines Axons führt dazu, daß sich diese lokalen Dichten an Kv α-Proteinen (*cluster*) auflösen. Danach werden die Kv α-Proteine nur noch diffus oder gar nicht mehr im Axon nachgewiesen. Die Umkehrung dieses Prozesses führt im myelinisierten Axon wieder zur lokalen Fixierung der Kv1.1 und Kv1.2 α-Proteine (Rasband et al., 1998). Für die Kv1.4 α-Proteine könnte ein ähnlicher, wenn nicht identischer Prozeß dazu führen, daß sie aus dem Pool der im endoplasmatischen Retikulum ungerichtet diffundierenden Kv α-Proteine gefischt, und über ein Gerüstprotein wie Paranodin am Ort ihrer Funktion fixiert werden. Dieser Proteinkomplex könnte dann ebenfalls durch entsprechende extrazelluläre Signale, wenn die K^+-Kanäle physiologisch nicht mehr benötigt werden, aufgrund einer Modifikation des Gerüstproteins, der

Depalmitylierung des PSD-95 Proteins entsprechend (siehe 4.6.), wieder zerfallen. Physiologisch erscheint diese Hypothese gerade in Bezug auf die hohe Plastizität der hippocampalen Neurone sehr sinnvoll, denn nur bei einem funktionellen Bedarf der entsprechenden Kv α-Proteine, würden diese an den Ort ihrer Funktion transportiert bzw. dort fixiert werden.
Ob eine dieser beiden Hypothesen, daß der gerichtete Transport einer geringen Menge heterolog exprimierter Proteine, der durch die Überladung des endoplasmatischen Retikulums maskiert ist, oder aber daß die Stufe der Polarisierung in den verwendeten Neuronen aufgrund zu schwacher interzellulärer Kontakte zu gering ist, so daß gar kein gerichteter Transport stattfinden kann, zutrifft, müssen weitere Versuche zeigen.

5.5. Palmitylierung der Kv1.1 β-Untereinheit

Ein weiteres Protein, das mit der Kv1.4 α-Untereinheit in Wechselwirkung treten kann, ist die Kv1.1 β-Untereinheit. Obwohl das Kv1.1 β-Protein keine membrandurchspannenden Proteindomänen aufweist, wird es aus Membranpräparationen isoliert (Parcej und Dolly, 1989). Die Palmitylierung von aminoterminalen Cysteinresten führt beim PSD-95 Protein und bei der β_{2A}-Untereinheit des L-Typ Ca^{2+}-Kanals zur Membranlokalisation. Durch einen Vergleich der Laufeigenschaften in der SDS-PAGE zwischen den Kv1.1 β- und den in der amimoterminalen Cysteinposition mutierten Kv1.1$\beta_{(C7S)}$ -Proteinen erscheint eine Palmitylierung unwahrscheinlich. Allerdings müßten hier alternative Versuche, wie beispielsweise die Verwendung von radioaktiv markierter Palmitinsäure, den direkten Nachweis liefern.

5.6. Ausblick

Das in der vorliegenden Dissertation entwickelte neuronale Expressionssystem könnte für weitere Untersuchungen des Proteintransportes der Kv α-Untereinheiten verwendet werden. Das hohe Potential des virusinduzierten Gentransfers, und die Möglichkeit, die heterlog exprimierten Proteine nach einer relativ kurzen Infektionsphase vor dem Hintergrund von endogen vorkommenden Kv α-Proteinen spezifisch (EGFP-Fluoreszenz oder anti-CD4-Antikörper) nachzuweisen, könnte bei Transportstudien in organotypischen Slicekulturen ausgenutzt werden. Bei der Infektion einer Slicekultur, die eine kompartimentspezifische Verteilung der endogenen Kv1.4 und Kv4.2 α-Untereinheiten aufweist, mit den in dieser Dissertation entwickelten Kv-Konstrukten, sollten diese ebenfalls subzellulär verteilt werden. Dabei könnte durch die Verwendung von Deletionsmutanten für die CD4-Konstrukte die transportbestimmende Proteindomäne näher charakterisiert werden. Entsprechende CD4-Mutanten könnten beispielsweise klären, ob die Wechselwirkung mit dem PSD-95 Protein und die damit induzierte lokale Fixierung der Kv1.4 α-Proteine Einfluß auf die kompartimentspezifische Verteilung nimmt. Der Proteintransport der mit EGFP markierten Konstrukte könnte passiv durch die Wechselwirkung mit endogenen Kv α-Untereinheiten stattfinden. Mit geeignetem technischen Equipment (Fluoreszenz-Videokamera und Mikroskopierkammer mit 5% CO_2-Atmosphäre) könnte der Proteintransport der EGFP-Konstrukte dann sogar online verfolgt werden.

Die Hypothese, daß die Zellpolarisierung der verwendeten primärkultivierten Hippocampusneuronen für einen gerichteten Proteintransport der Kv1.4 und Kv4.2 α-Untereinheiten nicht ausreicht, könnte durch Eichung des Expressionssystems kontrolliert werden. Dazu könnten virale Proteine, deren Transportverhalten nach einem viralen Gentransfer in primärkultivierten Neuronen bekannt ist, mit dem etablierten neuronalen Expressionssystem heterolog exprimiert werden. Beispielsweise könnten das Glykoprotein des *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV-G → somatodendritisch) und das Hemagglutinin des *Influenza Virus* (HA → axonal) dazu verwendet werden. Sollten diese viralen Proteine auch durch das hier beschriebene Expressionssystem gerichtet transportiert werden, wäre zumindest bewiesen, daß die Ursache der ungerichteten Verteilung der Kv1.4 und Kv4.2 α-Proteine in der Beschaffenheit der verwendeten Neuronenkulturen liegt.

Durch Verwendung der viralen Eichproteine könnten auch die Bedingungen der Infektion weiter optimiert werden. Bei Kenntnis der Transportorientierung könnte das Zeitfenster, in dem die initial synthetisierte Menge an heterolog exprimierten Proteinen noch gerichtet transportiert wird, identifiziert werden, und dadurch eine Überladung des endoplasmatischen Retikulums durch frühes Abbrechen der Infektion oder Blockierung der Proteinsynthese vermieden werden.

Die Frage, ob die alleinige Existenz von Gerüstproteinen, wie PSD-95, CASK oder Neurexinen (β-Neurexin oder Paranodin), zur subzellulären Fixierung der Kv α-Proteine ausreicht, könnte durch eine virusinduzierte Expression dieser Proteine genauer analysiert werden. Dabei könnten entweder primär kultivierte Neurone, die endogen die Kv1.4 oder 4.2 α-Proteine exprimieren, verwendet werden, oder eine Doppelinfektion durchgeführt werden, die zur gemeinsamen Expression von Gerüstproteinen und Kv α-Proteien in einem Neuron führt.

Das etablierte Expressionssystem könnte auch in Bezug auf andere Fragestellungen, wie beispielsweise der Funktionsanalyse von Kv-Kanälen, zur Anwendung kommen. Die heterologe Expression von Kv α-Untereinheiten in primärkultivierten Neuronen oder aber organotypischen Slicekulturen sollte auch zur Bildung von funktionalen Kv-Kanälen führen. Durch Markierung mit EGFP könnten die infizierten Neuronen mit den heterologen Kv-Kanäle relativ einfach identifiziert werden. Der Vorteil zur üblichen elektrophysiologischen Charakterisierung in Gewebekulturzellen ist, daß die Kanäle sich in ihrer natürlichen Umgebung befinden. Dadurch würden die heterologen Kanäle den Bedingungen *in vivo* entsprechend, beispielsweise durch Proteinkinasen, moduliert werden. Durch die Verwendung von entsprechenden Kv α-Mutanten könnten die daraus resultierenden Effekte auf die endogenen Kv-Kanäle analysiert werden. Denkbar wäre auch die Konzeption eines knock out Modells, in dem durch infizierte Kv α-Mutanten, und durch deren Wechselwirkung mit endogenen α-Untereinheiten, eine spezifische K^+-Leitfähigkeit blockiert werden kann.

6. Zusammenfassung

Bei der Rekonstitution der cDNA für die Kv4.2 α-Untereinheit wurden durch mehrere voneinander unabhängige Polymerase-Kettenreaktionen DNA-Fragmente von einer cDNA-Bank aus dem Hippocampus einer Ratte amplifiziert und sequenziert. Dabei wurden im Leserahmen zwei Punktmutationen im Vergleich zur publizierten Sequenz identifiziert, die zur Veränderung der Aminosäuresequenz führen (S537T und L586P). Desweiteren wurde im 3'-nichttranslatierten Bereich die Insertion eines 500 bp Fragmentes nachgewiesen, dessen Relevanz nicht bekannt ist.

Zur vergleichenden Analyse des gerichteten Proteintransportes zweier funktional verwandter Kv-Kanäle, dem Kv1.4 und Kv4.2, wurden in zwei Klonierungsstrategien Konstrukte für die entsprechenden Kv α-Untereinheiten entwickelt, die einen spezifischen Nachweis der heterolog exprimierten Konstrukte auch vor dem Hintergrund von endogen vorkommenden Kv α-Untereinheiten ermöglichten.

Die Markierung der Kv1.4 und Kv4.2 α-Untereinheiten mit EGFP wurde am distalen carboxyterminalen Ende durchgeführt, und führte dazu, daß die heterolog exprimierten Fusionsproteine Kv1.4/EGFP und Kv4.2/EGFP anhand der EGFP-Fluoreszenz direkt nachgewiesen werden konnten. Nach einer heterologen Genexpression in Gewebekulturzellen wurden die Fusionsproteine in den inneren Membranen der Zellen lokalisiert. Die resultierenden Expressionsmuster waren mit denen der entsprechenden Wildtypproteine vergleichbar. Die elektrophysiologische Charakterisierung der makroskopischen K^+-Ströme von Gewebekulturzellen, die mit den Fusionskonstrukten Kv1.4/EGFP und Kv4.2/EGFP transfiziert worden waren, zeigte, daß die mit EGFP markierten Kv α-Untereinheiten funktionale Kv-Kanäle bilden. Dabei werden die kinetischen Eigenschaften der Kv-Kanäle durch die Markierung mit EGFP nur unwesentlich beeinflußt.

Alternativ zur Markierung mit EGFP wurden Chimären aus dem CD4-Rezeptor und den Kv1.4 bzw. Kv4.2 α-Untereinheiten kloniert. In den resultierenden chimären Proteinen $CD4_{(ex+tm)}/Kv1.4_{(ct)}$ und $CD4_{(ex+tm)}/Kv4.2_{(ct)}$ wurde die extrazelluläre und membrandurchspannende Domäne des CD4-Rezeptorproteins und der zytoplasmatisch orientierte C-Terminus der Kv α-Untereinheiten exprimiert. Durch Verwendung eines polyklonalen anti-CD4-Antikörpers, der in Gewebekulturzellen und in primärkultivierten Neuronen keine Signale erzeugte, konnten die Chimären nach heterologer Genexpression immunologisch nachgewiesen werden. In Gewebekulturzellen zeigte die

$CD4_{(ex+tm)}$/$Kv1.4_{(ct)}$-Chimäre, im Gegensatz zum Kv1.4/EGFP, die Fähigkeit mit dem PSD-95 Protein in Wechselwirkung zu treten.

Zur Analyse eines gerichteten Proteintransportes unter neuronalen Bedingungen wurde zunächst ein neuronales Expressionssystem etabliert. Dazu wurden hippocampale und SCG-Neuronen präpariert und kultiviert. Mit spezifischen Antikörpern gegen MAP2a, tau und Neurofilament H wurde in den primärkultivierten hippocampalen Neuronen die polare Differenzierung in axonale und dendritische Zellkompartimente nachgewiesen. Zum Gentransfer erwies sich die Verwendung einer in Bezug auf die Laborsicherheit unbedenklichen Variante des Semliki-Forest-Virus als vorteilhafter gegenüber der chemischen Transfektion oder der Methode der Mikroinjektion. Die virale Expression der Kv1.4- und Kv4.2-Konstrukte wurde mit Hilfe der konfokalen Rasterlasermikroskopie untersucht. Dabei wurde für die heterolog exprimierten Proteine auch unter variierten Infektions- und Kultivierungsbedingungen, keine kompartimentspezifische Verteilung im Vergleich zu den endogenen Markerproteinen nachgewiesen.

Die potentielle Palmitylierung eines aminoterminalen Cysteinrestes in der Kv1.1 β-Untereinheit, die zur Membranlokalisation des Kv1.1 β-Proteins führen könnte, wurde untersucht. Dazu wurde das Laufverhalten des Wildtypproteins bei der elektrophoretischen Auftrennung in der SDS-PAGE mit dem Laufverhalten einer Cystein-Minusmutante ($Kv1.1\beta_{(C7S)}$) verglichen. Die aus einer Palmitylierung resultierende Veränderung des Laufverhaltens wurde dabei nicht nachgewiesen.

6.1. Summary

The cDNA coding for the Kv4.2 α subunit was cloned by PCR. Sequencing of amplified fragments showed in comparison to the published sequence 2 point mutations that result in an alteration of the deduced amino acid sequence (S367T and L568P). Additionally a 500 bp insertion in the 3´untranslated region was detected, the relevance of which is not known.

To investigate the specific targeting of two functional related Kv channels, Kv1.4 and Kv4.2, within a neuron, cDNA constructs were developed that allow the detection of the corresponding heterologously expressed Kv channels against the background of their native counterparts.

In a first approach EGFP was fused to the carboxy termini of Kv1.4 and Kv4.2 α subunits, which enables a direct detection of the fusion proteins by EGFP fluorescence. After transient transfection of cultured cell lines with these constructs both proteins were localised in the inner membranes of the cells, which could also be shown by the heterologous expression of the corresponding wild type (wt) α subunits in these cell lines.

The electrophysiological charakterisation of the macroscopic K^+ currents of tissue culture cells after transfection with the fusion constructs Kv1.4/EGFP and Kv4.2/EGFP showed that EGFP fusion does not have any influence on channel assembly. The kinetic properties of Kv1.4/EGFP and Kv4.2/EGFP channels were similar to those of the wt channels.

In a second approach the carboxy terminal sequences of Kv1.4 and Kv4.2 were fused to CD4 receptor (CD4) containing the extracellular and membrane spanning domain. The resulting chimeric proteins $CD4_{(ex+tm)}/Kv1.4_{(ct)}$ and $CD4_{(ex+tm)}/Kv4.2_{(ct)}$ could be detected by a polyclonal anti-CD4 antiserum after heterologous expression in tissue culture cells and primary cultured neurons. A criterium for evaluation of the functionality of the Kv channel α subunit carboxy terminus in the $CD4_{(ex+tm)}/Kv1.4_{(ct)}$ chimera was the ability to interact with PSD-95. In contrast to the Kv1.4/EGFP the chimeric $CD4_{(ex+tm)}/Kv1.4_{(ct)}$ construct showed this ability after cotransfection with PSD-95 as had been demonstrated before for the wt Kv1.4.

To be able to analyse the targeting of the described protein constructs in neurons a neuronal expression system was developed. Primary cultured hippocampal neurons differentiated into axonal and dendritic compartments as was detected by indirect immunofluorescence using antibodies directed against the neuronal marker proteins MAP2a, tau and neurofilament H.

In comparison to chemical transfection and microinjection a viral expression system has advantages concerning the introduction of the described Kv1.4 and Kv4.2 cDNA constructs into the primary cultured neurons. The established viral expression system was based on a biologically safe variant of the semliki forest virus (SFV). Viral expression of the different Kv channel constructs was investigated by confocal laser-scanning microscopy. Using this system with varying conditions for culturing and infection, it could not be shown that there is any compartment specific distribution of the fusion proteins or chimeras in comparison to the neuronal marker proteins.

A potential modification of Kv channel β-subunits may be the palmitoylation of these proteins. The palmitoylation of an amino terminal cystein of the Kvβ1.1 subunit that may lead to membrane localisation was investigated *in vitro*. Heterologously expressed Kvβ1.1 protein and the cystein mutant Kv1.1 $\beta_{(C7S)}$ were tested for a mobility shift in SDS-PAGE. With this analysis a palmitoylation of Kv β1.1 could not be detected.

7. Literaturverzeichnis

Aidley, D.J. und Stanfield, P.R. (1996). Ion Channels – Molecules in action; Cambridge; Cambridge University Press.

Alonso, G. und Widmer, H. (1997). Clustering of Kv4.2 potassium channels in postsynaptic membrane of rat supraoptic neurons: an ultrastructural study. *Neuroscience*; **77**, 617-21.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K (1996). Current protocols in molecular biology; *Greene Publishing Associates and Whiley-Interscience*; New York.

Baeuerle, P.A: und Baltimore, D. (1996). NF-κB: Ten years after. *Cell*; **87**, 13-20.

Baldwin, T.J., Tsaur, M.L., Lopez, G.A., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1991). Characterization of a mammalian cDNA for an inactivating voltage-sensitive K^+ channel. *Neuron*; **7**, 471 – 483.

Banker, G. und Goslin, K (1991). Cultering Nerve Cells. *MIT Press*; Cambridge, MA.

Bartelsen, N. (1995). Der Plasmamembrantransport des Kv-1.4-Proteins ist abhängig von Tyrosin in einem β-Turn im cytoplasmatischen Carboxyterminus; *Dissertation*; Universität Hamburg.

Baukrowitz, T. und Yellen, G. (1995). Modulation of K^+ current by frequency and external (K^+): a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron*; **15**, 951-60.

Beckh, S. und Pongs, O. (1990). Members of the RCK potassium channel family are differentially expressed in the rat nervous system. *EMBO J.*; **9**, 777-82.

Bellen, H.J., Lu, Y., Beckstead, R., Bhat, M.A. (1998). Neurexin IV, caspr and paranodin – novel members of the neurexin family: encounters of axons and glias. *Trends Neurosci.*; **21**, 444-9.

Berglund, P., Sjoberg, M., Garoff, H., Atkins, G.J., Sheahan, B.J., Liljestrom, P. (1993). Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology;* **11, *916-20.***

Berridge, M.J. (1998). Neuronal Calcium Signaling. *Neuron*; **21**, 13-26.

Biewenga, J.E., Destree, O.H., Schrama, L.H. (1997). Plasmid-mediated gene transfer in neurons using the biolistics technique. *J. Neurosci. Methods*; **71**, 67-75.

Bradke, F. und Dotti, C.G. (19979. Neuronal Polarity: Vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. *Neuron*; **19**, 1175-86.

Caceres, A., Banker, G.A., Binder, L. (1986). Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.*; **6**, 714-22.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W., Prasher, D. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*; **263**, 802-5.

Chandy, K.G., Douglass, J., Gutman, G.A., Jan, L., Joho, R., Kaczmarek, L., McKinnon, D., North, R.A., Philipson, L., Ribera, A.B., Rudy, B., Salkoff, L., Swanson, R.A., Steiner, D., Tanouye, M., Temple, B.L. (1991). Simplified gene nomenclature. *Nature*; **352**, 26.

Chandy, K.G. und Gutman, G.A. (1995). *Handbook of receptors and channels.* CRC Press; Boca Raton; **Vol. 1**, 1-71.

Chen, C. und Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.*; **7**, 2745-52

Chien, A.J., Carr, K.M., Shirokov, R.E., Rios, E., Hosey, M.M. (1996). Identification of palmitoylation sites within the L-type Calcium channel β_{2a} subunit and effects on channel function. *J. Biol. Chem.*; **271**, 26465-8

Cho, K.-O., Hunt, C.A., Kennedy, M.B. (1992). The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron*; **9**, 929-42.

Cormack, B., Valdivia, R.., Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*; **173**, 33-38.

Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Stober, W. (1991). *Current Protocols in Immunology*; J. Wiley & sons; New York.

Craig, A.M. und Banker, G. (1994). Neuronal polarity. *Annu. Rev. Neurosci.*; **17**, 267-310.

De Hoop, M., von Poser, C., Ikonen, E., Hunziker, W., Dotti, C.G. (1995). Intracellular routing of the wild-type and mutated polymeric immunoglobulin receptor in hippocampal neurons in culture. *J. Cell. Biol.*; **130**, 1447-59.

Dotti, C.G. und Simons, K. (1990). Polarized sorting of viral glycoproteins to the axon and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Cell*; **62**, 63-72.

Ehlers, M.D., Mammen, A.L., Lau, L.-F., Huganir, R.L. (1996). Synaptic targeting of glutamate receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.*; **8**, 484-9.

Einheber, S., Zanazzi, G., Ching, W., Scherer, S., Milner, T.A., Peles, E., Salzer, J.L.(1997). The axonal membrane protein caspr, a homologue of neurexin IV, is a component of the septate-like paranodal junctions that assemble during myelination. *J. Cell Biol.*; **139**, 1495-1506.

Feinberg A.P. und Vogelstein B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*; **132**, 6-13; sowie die Ergänzung: 1984; gleicher Titel; *Anal. Biochem.*; **137**, 266.

Felgner, J.H., Kumar, R., Sridhar, C.N., Wheeler, C.J., Tsai, Y.J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., Felgner, P.L. 81994). Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem.*; **269**, 2550-61.

Glasgow, G.M., Sheahan, B.J., Atkins, G.J., Wahlberg, J.M., Salminen, A., Liljestrom, P. (1991). Two mutations in the envelope glycoprotein E2 of Semliki Forest virus affecting the maturation and entry patterns of the virus alter pathogenicity for mice. *Virology*; **185**, 741-8.

Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*; **23**, 175-182.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*; **36**, 59-72.

Hata, Y., Butz, S., Südhof, T.C. (1996). CASK: a novel *dlg*/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neurexins. *J. Neurosci.*; **16**, 2488-94.

Heim, R., Prasher, D., Tsien, R. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **91**, 12501- 12504.

Herlitze, S. und Koenen, M. (1990). A general and rapid mutagenesis method using polymerase chain reaction. *Gene*; **91**, 143-7.

Higuchi, R., Krummel, B., Saiki, R.K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.*; **16**, 7351-67 .

Hille, B. (1992). Ionic channel of excitable membranes. *Sinauer Sunderland*, Massachusetts.

Hodge, T.W., Sasso, D.R., McDougal, J.S. (1991). Humans with OKT4-epitope deficiency have a single nucleotide base change in the CD4 gene, resulting in substitution of TRP240 for ARG240. *Hum. Immunol.*; **30**, 99-104.

Hoffman, D.A., Magee, J.C., Colbert, C.M., Johnston, D. (1997); K^+ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature*; **387**, 869-75.

Hoffman, D.A., Johnston, D. (1998). Downregulation of transient K^+ channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal Neurons by activation of PKA and PKC. *J. Neurosci*.; **18**, 3521-8.

Hoshi, T., Zagotta, W.N., Aldrich, R.W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science*; **250**, 533-8.

Hurtley, S.M. (1996). Protein targeting. *Oxfort University Press*; New York.

Ikeda, S.R., Soler, F., Zuhlke, R.D., Joho, R.H., Lewis, D.L. (1992). Heterologous expression of the human potassium channel Kv2.1 in clonal mammalian cells by direct cytoplasmic microinjection of cRNA. *Pflügers Arch.*; **422**, 201-3.

Ikonen, E., Parton, R.G., Hunziker, W., Simons, K., Dotti, C.G. (1993). Transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor in cultured in hippocampal neurons. *Curr. Biol*.; **3**, 635-644.

Ionoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*; **96**, 14-7.

Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., Takai, Y., Rosahl, T.W., Südhof, T.C. (1997). Binding of neuroligins to PSD-95. *Science*, **277**, 1511-5.

Isacoff, E.Y., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (1991). Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in *Shaker* K^+ channel. *Nature*; **353**, 86-90.

Jan, L.Y. und Jan Y.N. (1992). Structural elements involved in specific K^+channel functions. *Ann. Rev. Physiol*.; **54**, 537-55.

Jareb, M. und Banker, G. (1998). The polarized sorting of membrane proteins expressed in cultured hippocampal neurons using viral vectors. *Neuron*, **20**, 855-67.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M. (1996); deutsche Ausgabe *Neurowissenschaften – Eine Einführung*; Berlin; Spektrum Akad. Verl. GmbH.

Kistner, U., Wenzel, B.M., Veh, R.W., Cases-Langhoff, C., Garner, A.M., Appeltauer, U., Voss, B., Gundelfinger, E.D., Garner, C.C. (1993). SAP90, a rat presynaptic protein related to the product of the *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg-A*. *J. Biol. Chem*.; **268**, 4580-3.

Kornau, H., Seeburg, P., Kennedy, M. (1997). Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.*; **7**, 368-73.

Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*; **44**, 283-92.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; **227**, 680-5.

Le Gouill, C., Parent, J.L., Rola-Pleszczynski, M., Stankova, J. (1994). Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal. Biochem.*; **219**, 164.

Le Maout, S., Sewing, S., Coudrier, E., Elalouf, J.M., Pongs, O., Merot, J. (1996). Polarized targeting of a *shaker*-like (A-type) K(+)-channel in the polarized epithelial cell line MDCK. *Mol. Membr. Biol.*; **13**, 143-7.

Le Maout, S., Brejon, M., Olsen, O., Merot, J., Welling, P.A. (1997). Basolateral membrane targeting of a renal-epithelial inwardly rectifying potassium channel from the cortical collecting duct, CCD-IRK3, in MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; **94**, 13329-34.

Menegoz, M., Gaspar, P., Le Bert, M., Galvez, T., Burgaya, F., Palfrey, P.E., Arnos, F., Girault, J.-A. (1997). Paranodin, a glycoprotein of neuronal paranodal membranes. *Neuron*; **19**, 319-31.

McNamara, N.M.C., Averill, S., Wilkin, G.P., Dolly, J.O., Priestley, J.V. (1996). Ultrastructural localization of a voltage-gated K^+ channel α subunit (Kv1.2) in the rat cerebellum. *Eur. J. Neurosci*., **8**, 688-99.

Li, M., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (1992). Specification of subunit assembly by the hydrophillic amino-terminal of the *Shaker* potassium channel. *Science*, **257**, 1225-40.

Liljeström, P. und Garoff, H. (1991). A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest Virus replicon. *Bio/Technology*; **9**, 1356-61.

Limann, E.R., Tytgard, J., Hess, P. (1992). Subunit stoichiometry of a mammalianK+ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron*; **9**, 861-71.

Lindl, T. und Bauer, J. (1989). Zell- und Gewebekultur: Eine Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. *Gustav Fischer Verlag*; **2. Aufl**., Stuttgart.

Malone, R.W., Felgner, P.L., Verma, I.M. (1989). Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **86**, 6077-81.

Maltetic-Savatic, M., Lenn, N.J., Trimmer, J.S. (1995). Differential spatiotemporal expression of K^+ channel polypeptides in rat hippocampal neurons developing *in situ* and *in vitro*. *J. Neurosci*.; **15**, 3840-51.

Matter, K., und Mellman, I. (1994). Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol*.; **6**, 545-54.

MacKinnon, R. (1991). Determinationof the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature*; **350**, 232-5.

Missler, M. und Südhof, T.C. (1998). Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends Genet*.; **14**, 20-6.

Missler, M., Feranandez-Chacon, R., Südhof, T.C. (1998). The making of neurexins. *J. Neurochem*.; **71**, 1339-47.

Niethammer,M., Valtschanoff, J.G., Kapoor, T.M., Allison, D.W., Weinberg, R.J., Craig, A.M., Sheng, M. (1998). CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP-90. *Neuron*; **26**, 639-707.

Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., Remington, S.J. (1996). Crystal Structure of the Aequorea victoria Green Fluorescent Protein. *Science*; **273**, 1392-5

Pahl, H.L., Baeuerle, P.A. (1997). The ER-overload response: activation of NF-κB. *TIBS*; **22**, 63-7.

Parcej, D.N. und Dolly, J.O. (1989). Dendrotoxin acceptor from bovine synaptic plasma membranes. Binding properties, ourification and subunit composition of a putative constituent of certain voltage activated K^+ channels. *Biochem. J*.; **257**, 899-903.

Peles, E., Joho, K., Plowman, G.D., Schlessinger, J. (1997). Close similarity between drosophila neurexin IV and mammalian caspr protein suggests a conserved mechanism for cellular interactions. *Cell*; **88**, 745-6.

Peles,E., Nativ, M., Lustig, M., Grumet, M., Schilling, J., Martinez, R., Plowman, G.D., Schlessinger, J. (1997b). Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions. *EMBO J*., **16**, 978-88.

Petroski, R.E. und Geller H.M. (1994). Selective labeling of embryonic neurons cultured on astrocyte monolayers with 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA). *J. Neurosci. Meth*.; **52**, 23-32.

Pfaffinger, P.J. und DeRubeis, D. (1995). *Shaker* K^+ channel T1 domain self-tetramerizes to a stable structure. *J. Biol. Chem*.; **270**, 28595-600.

Pongs, O. (1992). Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol. Rev*.; **72**, 69-88.

Ponting, C.P., Phillips, C., Davies, K.E., Blake, D.J. (1997). PDZ domains: targeting signaling molecules to sub-membranous sites. *BioEssays*; **19**, 469-79.

Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene*; **111**, 229-33.

Rasband, M.N., Trimmer, J.S., Schwartz, T.L., Levinson, S.R., Ellisman, M.H., Schachner, M., Shrager, P. (1998). Potassium channel distribution, clustering, and function in remyelinating rat axons. *J. Neurosci*.; **18**, 36-47.

Rashtchian, A., Thornton, C.G., Heidecker G. (1992). A novel method for site-directed mutagenesis using PCR and uracil DNA glycosylase. *PCR Methods Appl*.; **2**, 124-30 .

Roberds, S.L., Tamkun, M.M. (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.

Robert-Koch-Institut; 1996; Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Gentechnische Arbeiten mit dem Semliki Forest Virus- und dem Sindbis Virus- Expressionssystem; *http://www.rki.de/GENTEC/ZKBS/VERGLEICHBARKEIT/SINDBIS/SINDBIS.HTM;* **Oktober 1996**, 1-7.

Rodriguez-Boulan, E., Sabatini, D.D. (1978). Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; **75**; 5071-5.

Roeper, J., Sewing, S., Zhang, Y., Wanner, S.G., Pongs, O. (1998). NIP domain prevents N-type inactivation in voltage-gated potassium channels. *Nature*; **391**, 390-3.

Roeper, J., Lorra, C., Pongs, O. (1997). Frequency-dependent inactivation of mammalian A-type K^+ channel Kv1.4 regulated by Ca^{2+}/Calmodulin-dependent protein kinase. *J. Neurosci*.; **15**, 3379-91.

Ruppersberg, J.P., Stocker, M., Pongs, O., Heinemann, S.H., Frank, R., Koenen, M. (1991). Regulation of fast inactivation of cloned I_k(A) channels by cystein oxidation. *Nature*; **352**, 711-4.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Ehrlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*; **239**, 487-91.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. **2. Aufl**. Cold Spring Harbour, New York: *Cold Spring Harbour Laboratory Press*.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; **74**, 5463-7.

Scannevin, R.H., Murakoshi, H., Rhodes, K.J., Trimmer, J.S. (1996). Identification of a cytoplasmic domain important in the polarized expression and clustering of the Kv2.1 K^+ channel. J. Cell Biol.; 135, 1619-32.

Shen, N.V., Chen, X., Boyer, M.M., Pfaffinger,P. (1993). Deletion analysis of K^+ channel assembly. *Neuron*; **11**, 67-76.

Sheng, M., Tsaur, M., Jan, N.Y., Jan, L.Y. (1993). Subcellular segregation of two A-type K^+ channel proteins in rat central neurons. *Neuron*; **9**, 271-84.

Sheng, M., Liao, Y.J., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (1992). Presynaptic A-current based on heteromultimeric K^+ channels detected in vivo. *Nature*; **365**, 72-5.

Sheng, M und Kim, E. 81996). Ion channel associated proteins. *Curr. Opin. Neurobiol*.; **6**, 602-8.

Sheng, M. und Wyszynski, M. (1997). Ion channel targeting in neurons. *BioEssays*; **19**, 847-53.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol*.; **98**, 503-17 .

Spitzer, N.C. (1991). A developmental handshake: neuronal control of ionic currents and thei control of neuronal differentiation. *J. Neurobiol*.; **7**, 659-73.

Stamatatos, L., Leventis, R., Zuckermann, M.J., Silvius, J.R. (1988). Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles and biological membranes. *Biochemistry* ; **27**, 3917-25.

Stanley, P. und Siminovitch, L. (1977). Complementation between mutants of CHO cells resistant to a variety of plant lectins. *Somatic Cell Genet*.; **3**, 391-405.

Tienari, P.J., De Strooper, B., Ikonen, E., Simons, M., Weidemann, A., Czech, C., Hartmann, T., Ida, N., Multhaup, G., Masters, C.L., Van Leuven, F., Beyreuther, K., Dotti, C.G. (1996). The β-amyloid domain is essential for axonal sorting of amyloid precursor protein. *EMBO J*.; **15**, 5218-29.

Topinka, J.R. und Bredt, D.S. (1998). N-terminal palmitoylation of PSD-95 regulates association with cell membranes and interaction with K^+-channel 1.4. *Neuron*; **20**, 125-34.

Van't Hof, W. und Resh, M.D. (1997). Rapid plasma membrane anchoring of newly synthesized p59fyn: selective requirement for NH2-terminal myristoylation and palmitoylation at cysteine-3. *J. Cell Biol.*; **136**, 1023-35.

Veh, R.W., Lichtinghagen, R, Sewing, S., Wunder, F., Grumbach, I.M., Pongs, O. (1995). Immunohistochemical localization of five members of the Kv1 channel subunits: contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localizations in rat brain. *Eur. J. Neurosci.*; **7**, 2189-2205.

Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; **76**, 615-9.

Wang, H., Kunkel, D.D., Schwartzkroin, P.A., Tempel, B.L. (1994). Localization of Kv1.1 and Kv1.2, two K channel proteins, to synaptic terminals, somata, and dendrites in the mouse brain. *J. Neurosci.*; **14**, 4588-99.

Wedegaertner, P.B. und Bourne, H.R. (1994). Activation and depalmitoylation of Gs alpha. *Cell*; **77**, 451-64.

Werner, M., Madreperla, S., Lieberman, P., Adler, R. (1990). Expression of transfected genes by differentiated postmitotic neurons and photoreceptors in primary cell cultures. *J. Neurosci. Res.*; **25**, 50-7.

Yang, F., Moss, L.G., Phillips, G.N.jr. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*; **14**, 1246-1251.

Zagotta, W.N., Hoshi, T., Aldrich, R.W. (1990). Restoration of inactivation mutants of *Shaker* potassium channels by a peptide derived from *Sh*B. *Science*; **250**, 568-70.

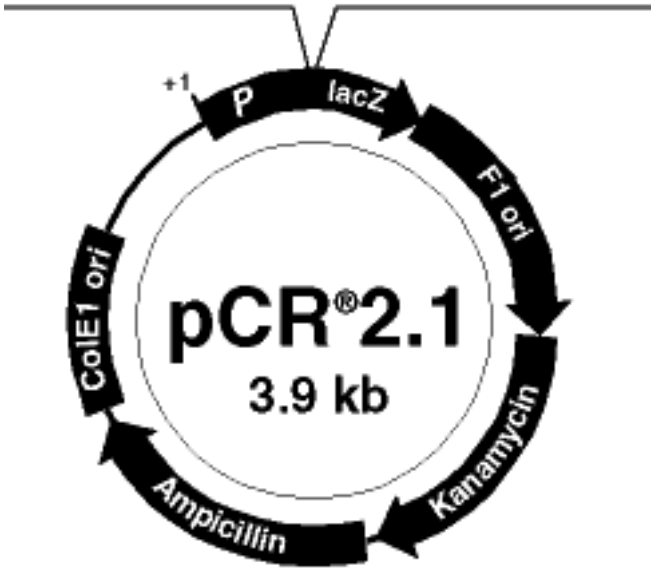
8. Anhang

8.1. Klonkarten

1. Klonkarte des TA-Vektors pCR2.1 (Fa. Invitrogen):

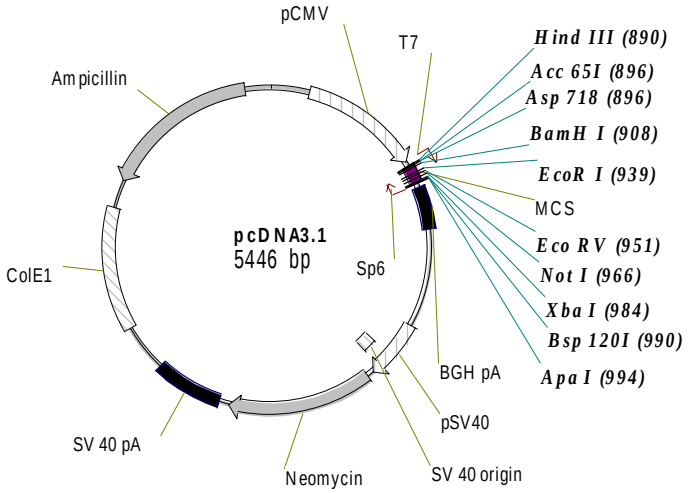
P	→ CMV-Promoter	LacZ	→	LacZ α-Fragment
Resistenzgene	→ Kanamycin, Ampicillin	Replikationursprung	→	ColE1, F1

Klonierungsstelle für das PCR-Fragment

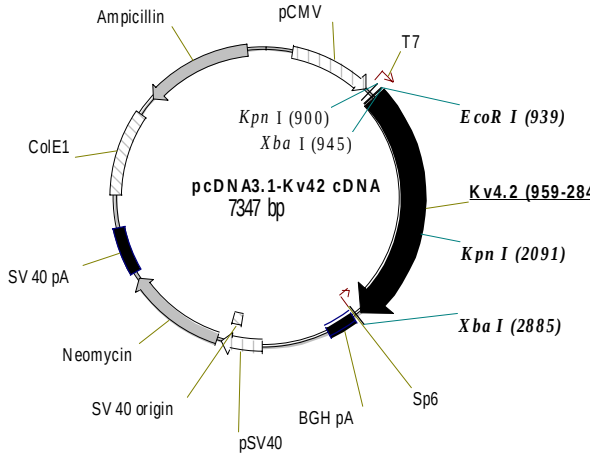


2. Klonkarte pcDNA3.1:

Promotoren	→ pCMV, pSV40	Polyadenylierungssignal	→	BGH pA, SV40pA
Resistenzgene	→ Neomycin, Ampicillin	RNA-Polymerasebindestellen	→	T7, Sp6
MCS	→ Universielle Klonierungsstelle	Replikationursprünge	→	ColE1, SV40 origin

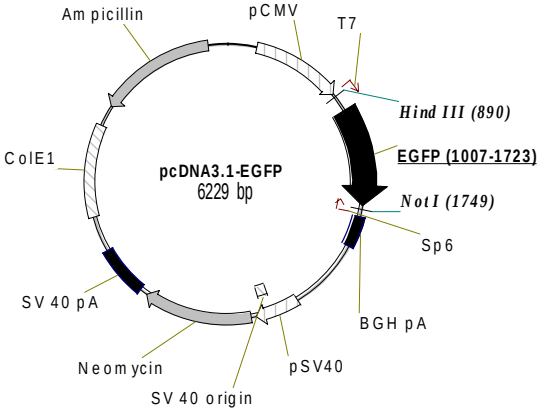


3. Klonkarte pcDNA3.1-Kv4.2 cDNA:

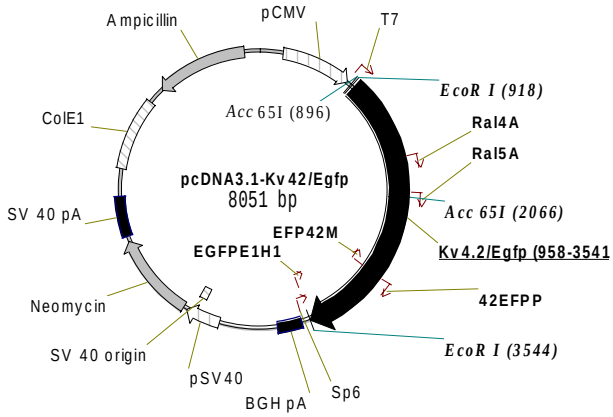


4. Klonkarte pcDNA3.1-EGFP:

(Beschreibung der Vektorelemente siehe pcDNA3.1)

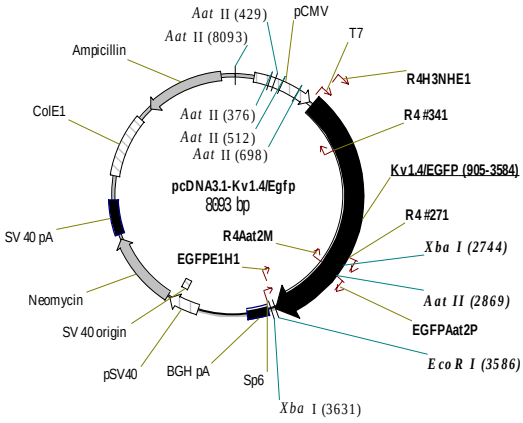


5. Klonkarte pcDNA3.1-Kv4.2/EGFP:

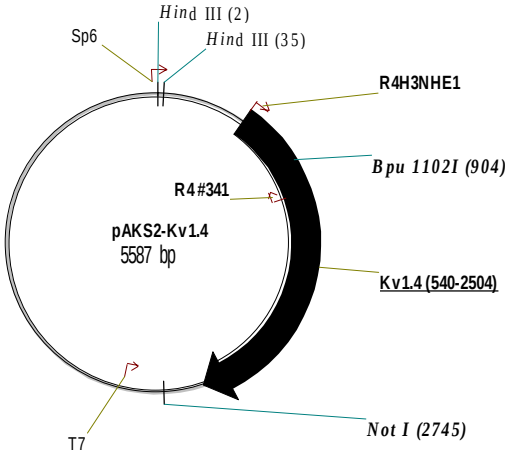


6. Klonkarte pcDNA3.1-Kv1.4/EGFP:

(Beschreibung der Vektorelemente siehe pcDNA3.1)

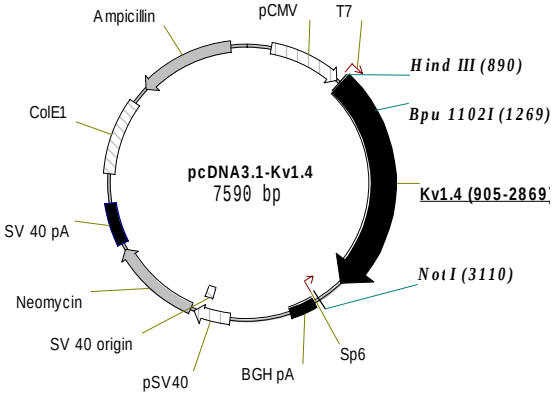


7. Klonkarte pAKS2-Kv1.4:



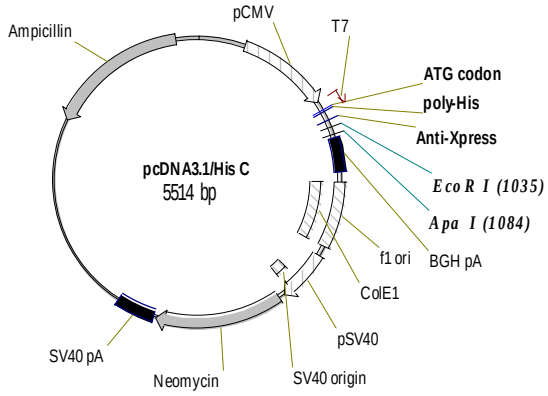
8. Klonkarte pcDNA3.1-Kv1.4:

(Beschreibung der Vektorelemente siehe pcDNA3.1)

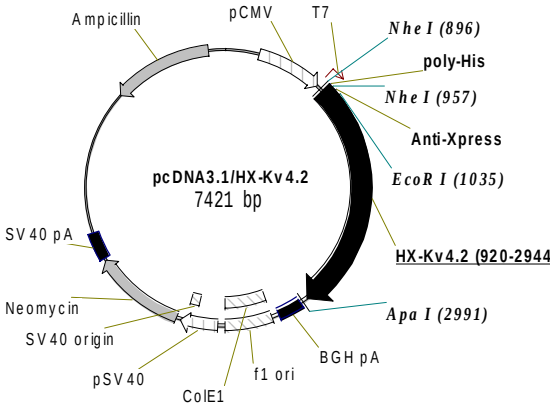


9. Klonkarte pcDNA3.1/HIS C:

(Beschreibung der Vektorelemente siehe pcDNA3.1)

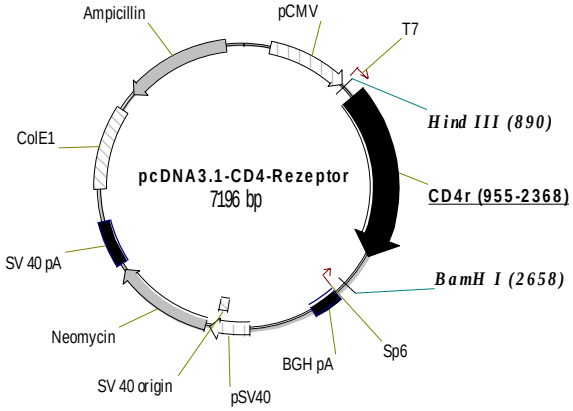


10. Klonkarte pcDNA3.1/HX-Kv4.2:



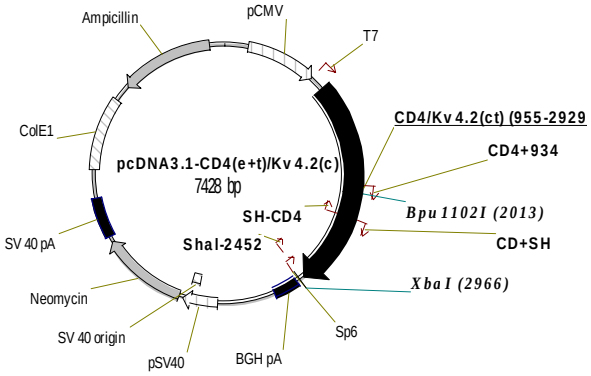
11.Klonkarte pcDNA3.1-CD4r:

(Beschreibung der Vektorelemente siehe pcDNA3.1)



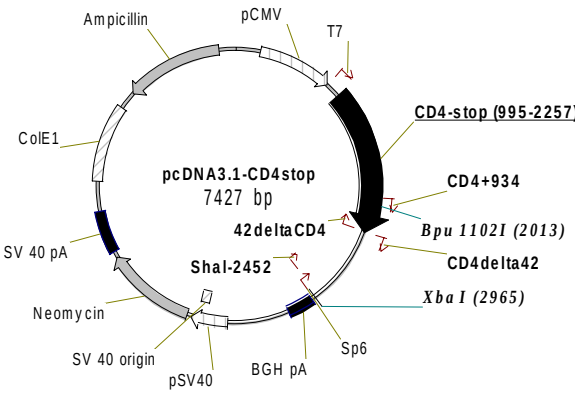
12. Klonkarte pcDNA3.1-CD4$_{(ex+tm)}$/Kv4.2$_{(ct)}$:

(Beschreibung der Vektorelemente siehe pcDNA3.1)

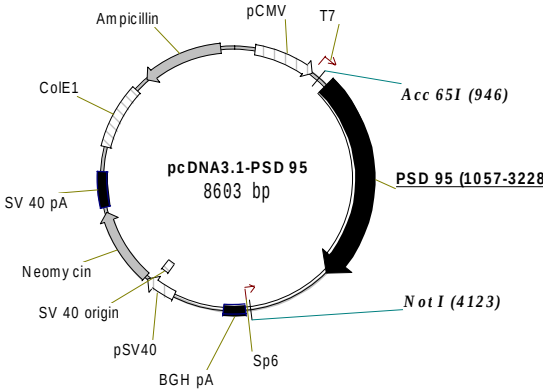


13. Klonkarte pcDNA3.1-CD4$_{stop}$:

(Beschreibung der Vektorelemente siehe pcDNA3.1)



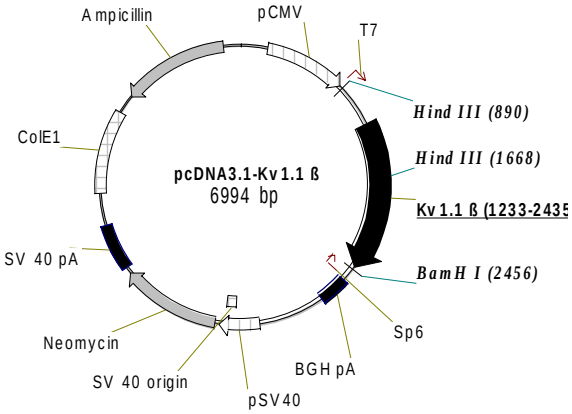
14. Klonkarte pcDNA3.1-PSD 95:

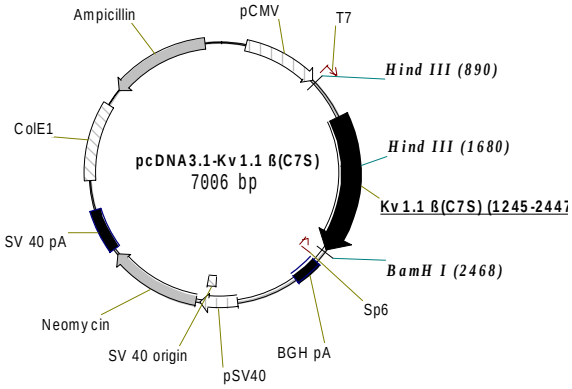


14. Klonkarte pcDNA3.1-Kv1.1 β:

15. Klonkarte pcDNA3.1-Kv1.1 $\beta_{(C7S)}$:

(Beschreibung der Vektorelemente siehe pcDNA3.1)



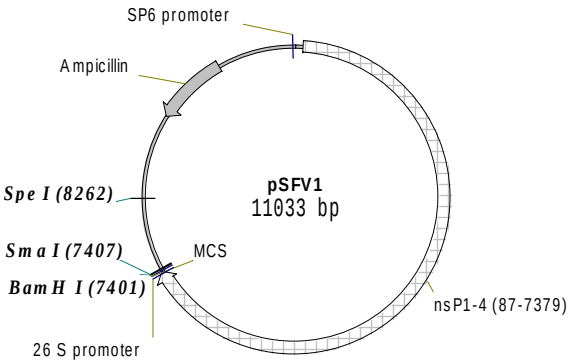


16. Klonkarte pSFV-1:

Promotoren → pCMV, pSV40

Resistenzgen → Ampicillin

MCS → Universielle Klonierungsstelle

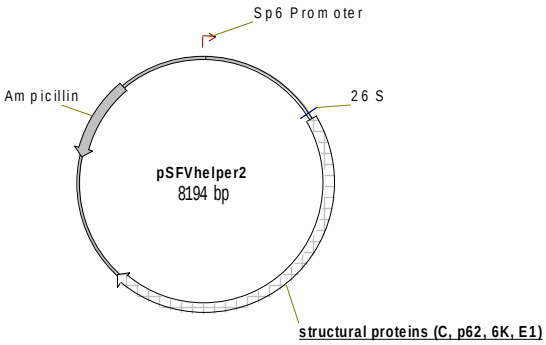


17. Klonkarte pSFV-helper2:

subgenomischer Viruspromoter → 26 S

RNA-Polymerasebindestelle → Sp6

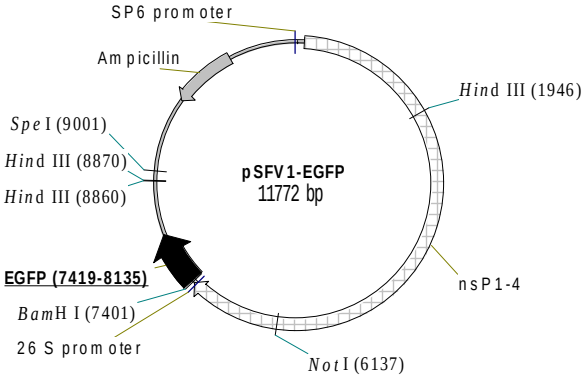
nsP1-4 → Gen für die Nichtstrukturproteine

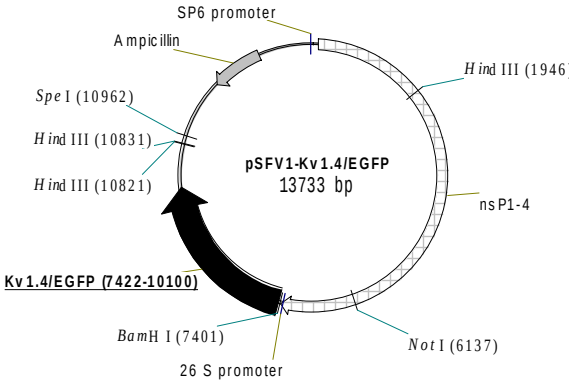


18. Klonkarte pSFV-EGFP:

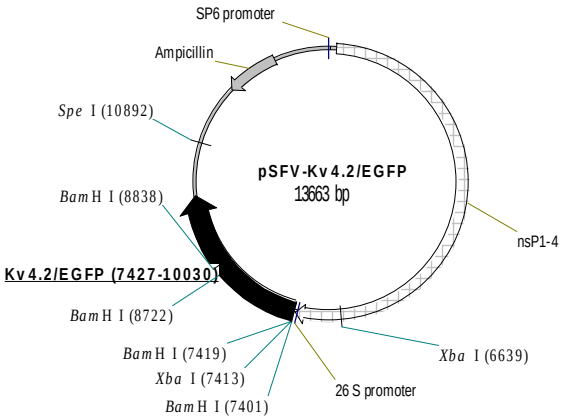
19. Klonkarte pSFV-Kv1.4/EGFP:

(Beschreibung der Vektorelemente siehe pSFV-1)



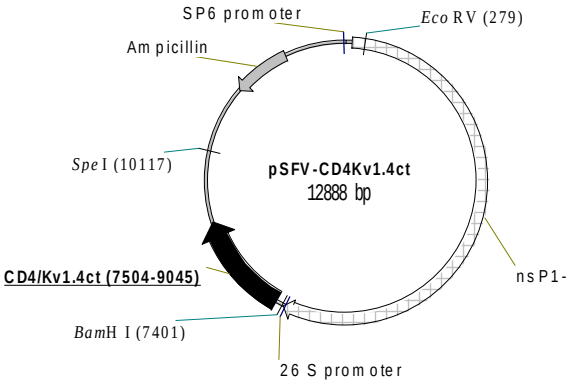


20. Klonkarte pSFV-Kv4.2/EGFP:



21. Klonkarte pSFV-CD4/Kv1.4$_{ct}$:

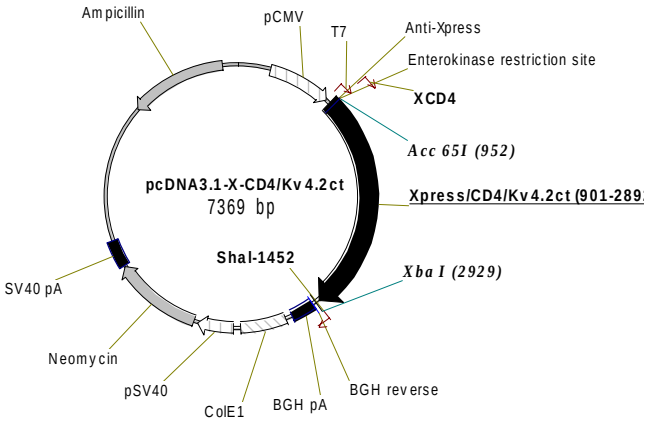
(Beschreibung der Vektorelemente siehe pSFV-1)

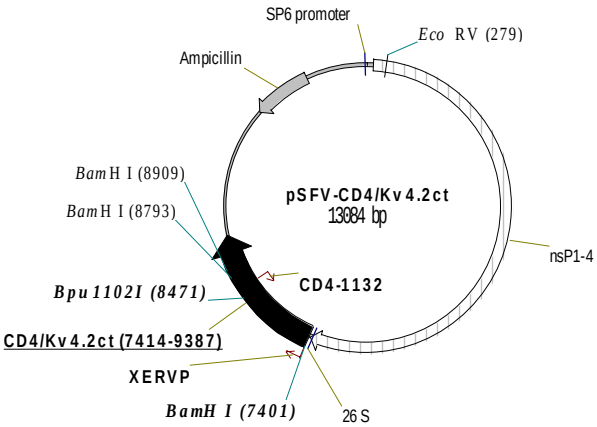


22. Klonkarte pSFV-CD4/Kv4.2$_{ct}$:(Beschreibung der Vektorelemente siehe pcDNA3.1 und pSFV-1)

Klonierungsschema:

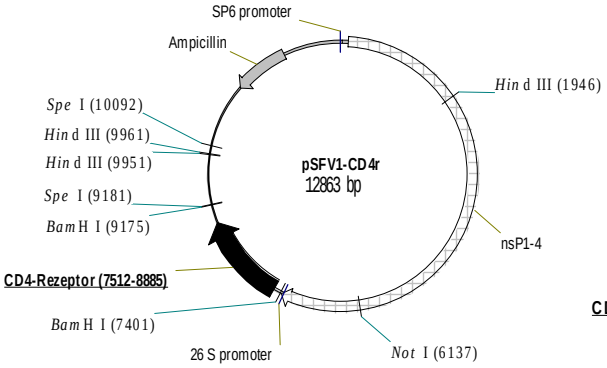
1. Einführung eines „Xpress-tag“ durch PCR (in vitro Mutagenese): *Template*: pcDNA3.1-X-Kv4.2, *Primer*: XCD4 (enthält Acc65 I Schnittstelle) und Shal-2452. Klonierung des (Acc65 I/Xba I)-PCR-Fragmentes in komplementär restringiertes (pcDNA3.1-X-Kv4.2)-Vektorfragment ergibt den Vektor pcDNA3.1-X-CD4/Kv4.2ct.
2. Einbau einer Kozaksequenz und Transfer in den pSFV-Vektor: PCR (*in vitro* Mutagenese): *Template*: pcDNA3.1-X-CD4/Kv4.2ct, *Primer*: XERVP (enthält EcoR V Schnittstelle) und CD4-1132. Drei-Fragmente-Klonierung von (EcoR V/Bpu1102 I)-PCR-Fragment, (Bpu1102 I/(Xba I)$_{aufgefüllt}$)-CD4/Kv4.2ct-Fragment und mit Sma I linearisiertem (pSFV-1)-Vektorfragment ergibt pSFV-CD4/Kv4.2ct. Die Sequenz des CD4/Kv4.2ct im pSFV-CD4/Kv4.2ct enthält eine Kozaksequenz am Startcodon sowie ein aminoterminalen „Xpress-tag“.



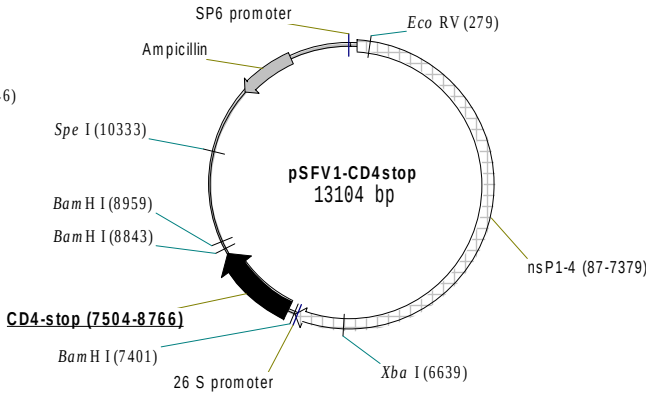


23. Klonkarte pSFV-CD4-Rezeptor:

(Beschreibung der Vektorelemente siehe pSFV-1)



24. Klonkarte pSFV-CD4$_{stop}$:



8.2. Veröffentlichungen und Kongreßbeiträge

Dietz, M., Balvers, M., Hunt, N.; 1994; Alternative splicing of the *human* TSH receptor: tissue distribution and gene organisation of the 1.3 kb and 1.7 kb variant transcripts; *J. Endocrinol.*; **17 (suppl. 1)**, 87.

8.3. Lebenslauf

Matthias Dietz geboren am 11. Oktober 1966 in Hamburg

Schulbildung

August 1973 - Juli1977	Besuch der Grundschule Musäusstraße in Hamburg
August 1977 - Juni1986	Besuch des Gymnasiums Willhöden in Hamburg
Juni 1986	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Wehrdienst

Juli 1986 – September 1987	Grundwehrdienst in Neumünster und Flensburg

Berufliche Tätigkeit

Oktober 1987 – September 1988	Bühnentechniker am Ernst-Deutsch-Theater Hamburg

Studium

Oktober 1988	Beginn des Chemiestudiums an der Universität Hamburg
September 1989	Diplomvorprüfung in Physik
November 1990	Diplomvorprüfungen in Organischer, Physikalischer und Anorganischer Chemie
Dezember 1993	Diplomhauptprüfungen für Studierende der Chemie
November 1994	Beendigung des Studiums mit Abgabe der Diplomarbeit, angefertigt am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung Hamburg bei PD Dr. W. Höppner; Thema: Charakterisierung der 3‘-Spleißstellen von zwei alternativ gespleißten TSH-Rezeptor-Varianten

Dissertation

Januar 1995 – Dezember 1998	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Neurale Signalverarbeitung bei Prof. Dr. O. Pongs, Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg
Januar 1996 – Oktober 1996	Unterbrechung der praktischen Arbeit aufgrund eines Sportunfalles

Hamburg, den 21. 01. 1999