

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 membran-durchspannende 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 Palmytylierung eines aminoterminalen Cysteinrestes in der Kv1.1 β -Untereinheit, die zur Membranlokalisierung 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 β _(C7S)) verglichen. Die aus einer Palmytylierung 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 characterisation 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 Kv β 1.1 subunit that may lead to membrane localisation was investigated *in vitro*. Heterologously expressed Kv β 1.1 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 β 1.1 could not be detected.