Klaus Hentrich

BKAP, ein neu entdecktes Protein, das mit dem C-Terminus des calcium- und spannungsabhängigen Kaliumkanals der Ratte interagiert



BKAP, ein neu entdecktes Protein, das mit dem C-Terminus des calcium- und spannungsabhängigen Kaliumkanals der Ratte interagiert

Dissertation zu Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften an der Fakultät für Chemie der Ruhr-Universität Bochum

> vorgelegt von Klaus Hentrich aus Hanau

Bochum 2002

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <u>http://dnb.ddb.de</u> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2003 Zugl.: Bochum, Univ., Diss., 2002 ISBN 3-89873-703-9

Tag der Disputation: 4. Februar 2003

Promotionskommission:

Prof. Dr. C. Wöll	(Vorsitz)
Prof. Dr. M. Hollmann	(Referent)
Prof. Dr. W. Stühmer	(Koreferent)
Prof. Dr. W. Schuhmann	(3. Prüfer)

Der überwiegende Teil dieser Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in der Abteilung Molekulare Biologie neuronaler Signale unter der Leitung von Prof. Dr. W. Stühmer angefertigt.

Ein Teil der Ergebnisse wurde am University College London im Wellcome Laboratory for Molecular Pharmacology in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Stocker erarbeitet.

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2003 Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen Telefon: 0551-54724-0 Telefax: 0551-54724-21 www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen. 1. Auflage, 2003 Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-703-9

Ι	Abkü	irzungsverzeichnis	VI
1	Einle	eitung	1
	1.1 Mole	kulare Diversität der Kaliumkanäle	1
	1.2 Der I	BK-Kanal	3
	1.3 Phys	iologische Funktionen des BK-Kanals	4
	1.4 Poter	ntielle Interaktionsnartner des BK-Kanals von Säugetieren	5
	1.4 Tote	dar varliagandan Arbait	5
		der vornegenden Arbeit	0
2	Mate	erial und Methoden	7
	2.1 Mate	erial	7
	2.1.1	Geräte	7
	2.1.2	Verbrauchsmaterialien	8
	2.1.3	Kits und Säulenmaterial	8
	2.1.4	Chemikalien	8
	2.1.4.1	Chemikalien und Lösungen	8
	2.1.4.2	Oligonukleotide	9
	2.1.4.3	Längenstandards für DNA	9
	2.1.4.4	Längenstandards für Protein	10
	2.1.5	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	10
	2.1.6	Nährmedien und Agarplatten	11
	2.1.6.1	E.coli	11
	2.1.6.2	S.cerevisiae	11
	2.1.6.3	Zellkultur	12
	2.1.7	Plasmide	12
	2.1.8	Enzyme und Proteine	13
	2.1.9	Antikörper	13
	2.1.9.1	Erstantikörper	13
	2.1.9.2	Zweitantikörper	13
	2.1.10	Biologisches Material	14
	2.1.10.1	Bakterienstämme	14
	2.1.10.2	Hefestamm	14
	2.1.10.3	Ratten (Rattus norvegicus)	14

2.2	Meth	oden	15
2	2.2.1	Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von DNA	15
	2.2.1.1	Klonierungsmethoden	15
	2.2.1.1	.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	15
	2.2.1.1	.2 Vektorpräparation	15
	2.2.1.1	.3 Elektrophoretische Trennung von DNA	16
	2.2.1.1	.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	16
	2.2.1.1	.5 Klonierung eines HA-Epitops in den Expressionsvektor pcDNA3.	17
	2.2.1.2	DNA-Amplifikation in Bakterien	17
	2.2.1.2	P.1 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> DH5α	17
	2.2.1.2	2.2 Ligation	18
	2.2.1.2	2.3 Transformation von <i>E. coli</i>	18
	2.2.1.2	2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Flüssigkulturen	19
	2.2.1.3	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
	2.2.1.4	PCR-Sequenzierung mit fluoreszierenden Terminatoren	22
2	2.2.2	Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von RNA	23
	2.2.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus neuronalem Gewebe	23
	2.2.2.2	cDNA-Erststrangsynthese	23
	2.2.2.3	Detektion von immobilisierter RNA (Northern Blot)	24
	2.2.2.3	8.1 Radioaktive Markierung von DNA	24
	2.2.2.3	9.2 Hybridisierung	24
2	2.2.3	Basismethoden der Biochemie	25
	2.2.3.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
	2.2.3.2	Coomassie-Färbung	26
	2.2.3.3	Transfer und Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	
		(Western Blot)	26
	2.2.3.4	Expression von rekombinanten Proteinen in Bakterien	27
	2.2.3.4	Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektroporation	28
	2.2.3.4	Elektroporation	28
	2.2.3.4	Anzucht von Bakterienkulturen für die Proteingewinnung	28
	2.2.3.5	Reinigung der rekombinanten Proteine	29
	2.2.3.5	6.1 GST-Fusionsproteine	29
	2.2.3.5	5.2 Proteine mit Hexahistidin- <i>Tag</i>	30

3

2.2.3.6	Gewinnung polyklonaler Antikörper	31
2.2.3.7	Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper	31
2.2.3.7	2.1 Entfernen von GST-Antikörpern	31
2.2.3.7	2.2 Reinigung an immobilisiertem Antigen	31
2.2.4	Untersuchung von Proteininteraktionen	32
2.2.4.1	Wechselwirkung mit membrangebundenen Proteinen (Filter Overlay)	32
2.2.4.2	Kosedimentation mit GST-Fusionsproteinen (GST-Pulldown)	33
2.2.4.2	8.1 Kosedimentation von in <i>E.coli</i> exprimierten Proteinen	33
2.2.4.2	2.2 Kosedimentation aus Lysaten von Säugetierzellen	33
2.2.4.3	Kovalente Kopplung an aktivierte Agarose	34
2.2.4.4	Das Zwei-Hybrid-System in Hefe	34
2.2.4.4	Das verwendete Hefesystem	34
2.2.4.4	.2 Transformation von Hefe	35
2.2.4.4	Präparation von Lachssperma-DNA für die Transformation	36
2.2.4.4	A.4 β-Galaktosidasetest	36
2.2.5	Experimente mit Säugetierzellinien in Kultur	36
2.2.5.1	Zellkultur	37
2.2.5.2	Transiente Transfektion	37
2.2.5.3	Lysate für Western- und Interaktionsstudien	37
2.2.5.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	38
2.2.5.5	Immunfluoreszenz	38
2.2.5.5	5.1 Beschichten von Deckgläsern	38
2.2.5.5	5.2 Nachweis der Proteine	38
2.2.6	Biochemische Experimente mit neuronalem Gewebe	39
2.2.6.1	Membranpräparation und Extraktion von Membranproteinen	39
2.2.6.2	Primärkultur von Hippcampus-Neuronen	40
Ergel	bnisse	41
3.1 Kloni	erung und Sequenzanalyse des BK-assoziierten Proteins, BKA	AP 41
3.1.1 I	dentifizierung von BKAP als potentieller Interaktionspartner von BK	41
3.1.2 E	BKAP kommt in mehreren Spleißvarianten im Gehirn der Ratte vor	45
3.1.3 E	BKAP ist zu einem Einzelstrang-DNA bindenden Protein homolog	46
3.2 Intera	aktionsstudien mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System	47
3.2.1 I	nteraktion von BKAP mit BK im Zwei-Hybrid-System	47
3.2.2 V	Verkürzen von BKAP verhindert die Interaktion mit BK	49

3.3	U	ntersuchungen zur Expression von BKAP in Ratten	51
3.	.3.1	Northern-Analyse zeigt eine weite Verbreitung des BKAP-Transkriptes	
		in Geweben der Ratte	51
3.	.3.2	BKAP und BK werden in Neuronen des peripheren Nervensystems	
		koexprimiert	52
3.	.3.3	Die Expressionsmuster von BKAP und BK im Gehirn der Ratte stimmen	
		weitgehend überein	54
3.4	B	iochemische Studien zur Interaktion von BKAP und BK mit	
	re	kombinanten Proteinen	56
3.	.4.1	Versuch des Nachweises der Interaktion zwischen BKAP und BK mit	
		Filter Overlay-Experimenten	57
3.	.4.2	GST-Kosedimentation bestätigt die Interaktion von BKAP mit dem	
		C-Terminus des BK-Kanals	58
3.	.4.3	Die Interaktionsdomäne läßt sich auf die 76 C-terminalen Aminosäuren	
		des BK eingrenzen	60
3.5	E	xpression und Lokalisierung von BKAP in Säugetierzellinien	63
3.	.5.1	Western-Analyse von transient exprimiertem BKAP in COS-7-Zellen	64
3.	.5.2	BKAP zeigt ein intensives Kernsignal und kolokalisiert mit BK an der	
		Plasmamembran von COS7-Zellen	66
3.6	V	ersuch der Kosedimentation des vollständigen, in Säugetierzellen	
	ex	primierten BK-Kanals mit BKAP	68
3.	.6.1	Bedingungen für die Detektion des BK-Kanals im Western Blot	68
3.	.6.2	Reinigung eines BK-Antiserums	69
3.	.6.3	Der vollständige BK-Kanal kosedimentierte nicht mit GST-BKAP	72
3.7	С	harakterisierung und subzelluläre Lokalisierung des nativen	
	B	KAP-Proteins	74
3.	.7.1	Reinigung und Charakterisierung eines polyklonalen BKAP-Antikörpers	74
3.	.7.2	Der BKAP-Antikörper erkennt eine spezifische Bande im Western Blot	
		aus dem Gehirn der Ratte	75
3.	.7.3	Der BK-Kanal, nicht aber BKAP, ist in der Membranfaktion aus Rattenhirn	L
		detektierbar	77
3.	.7.4	Der BKAP-Antikörper markiert den Kern von Hippocampus-Neuronen	79

3.8	Untersuchungen zum Kerntransport eines BK-Fragments	81
3.8	Der intrazelluläre C-Terminus des BK-Kanals enthält ein funktion	nelles
	Kerntransportsignal	
3.8	.2 Koexpression von BKAP führt zur Akkumulation des BK-C-Terr	ninus im
	Kern von Säugetierzellen	
4	Diskussion	90
4.1	Charakterisierung von BKAP	91
4.2	Interaktion von BKAP mit dem BK-Kanal	95
4.3	Hat der C-Terminus des BK-Kanals eine regulatorische Funl	ktion
	im Zellkern?	
5	Zusammenfassung	104
6	Literaturverzeichnis	
II	Anhang	IX
II.I	Oligonukleotide	IX
II.II	Übersicht der verwendeten Konstrukte	XI
II.III	Der Vektor pcDNA3-HA	XII
II.IV	Klonierungen	XII
II.V	Konzentrationen der Erstantikörper	XIV

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro- (10 ⁻⁶)
А	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
as	antisense (Oligonukleotid)
As	Aminosäure(n)
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bp	Basenpaare
BK	calcium- und spannungsabhängiger Kaliumkanal
ВКАР	BK-assoziiertes Protein
BSA	Rinderserumalbumin
С	Cytosin
cDNA	doppelsträngige Kopie einer mRNA
Ci	Curie $(3,7 \times 10^{10} \text{ Becquerel})$
cpm	counts per minute
cpm C-Terminus	counts per minute Carboxyterminus eines Proteins
cpm C-Terminus dCTP	<i>counts per minute</i> Carboxyterminus eines Proteins Desoxycytidintriphosphat
cpm C-Terminus dCTP DMEM	counts per minute Carboxyterminus eines Proteins Desoxycytidintriphosphat Dulbecco's Modified Eagle's Medium
cpm C-Terminus dCTP DMEM DMSO	counts per minute Carboxyterminus eines Proteins Desoxycytidintriphosphat Dulbecco's Modified Eagle's Medium Dimethylsulfoxid
cpm C-Terminus dCTP DMEM DMSO DNA	counts per minute Carboxyterminus eines Proteins Desoxycytidintriphosphat Dulbecco's Modified Eagle's Medium Dimethylsulfoxid Desoxyribonukleinsäure
cpm C-Terminus dCTP DMEM DMSO DNA DNAse	counts per minute Carboxyterminus eines Proteins Desoxycytidintriphosphat Dulbecco's Modified Eagle's Medium Dimethylsulfoxid Desoxyribonukleinsäure Desoxyribonuklease
cpm C-Terminus dCTP DMEM DMSO DNA DNAse dNTPs	counts per minute Carboxyterminus eines Proteins Desoxycytidintriphosphat Dulbecco's Modified Eagle's Medium Dimethylsulfoxid Desoxyribonukleinsäure Desoxyribonuklease Desoxynukleosidtriphosphat
cpm C-Terminus dCTP DMEM DMSO DNA DNAse dNTPs DTT	counts per minute Carboxyterminus eines Proteins Desoxycytidintriphosphat Dulbecco's Modified Eagle's Medium Dimethylsulfoxid Desoxyribonukleinsäure Desoxyribonuklease Desoxynukleosidtriphosphat Dithiothreitol
cpm C-Terminus dCTP DMEM DMSO DNA DNAse dNTPs DTT <i>E. coli</i>	counts per minute Carboxyterminus eines Proteins Desoxycytidintriphosphat Dulbecco's Modified Eagle's Medium Dimethylsulfoxid Desoxyribonukleinsäure Desoxyribonuklease Desoxynukleosidtriphosphat Dithiothreitol Escherichia coli
cpm C-Terminus dCTP DMEM DMSO DNA DNAse dNTPs DTT <i>E. coli</i> EDTA	counts per minuteCarboxyterminus eines ProteinsDesoxycytidintriphosphatDulbecco's Modified Eagle's MediumDimethylsulfoxidDesoxyribonukleinsäureDesoxyribonukleaseDesoxynukleosidtriphosphatDithiothreitolEscherichia coliEthylendiamintetraessigsäure
cpm C-Terminus dCTP DMEM DMSO DNA DNAse dNTPs DTT <i>E. coli</i> EDTA <i>et al.</i>	counts per minuteCarboxyterminus eines ProteinsDesoxycytidintriphosphatDulbecco's Modified Eagle's MediumDimethylsulfoxidDesoxyribonukleinsäureDesoxyribonukleaseDesoxynukleosidtriphosphatDithiothreitolEscherichia coliEthylendiamintetraessigsäureet alii, et aliae oder et alia
cpm C-Terminus dCTP DMEM DMSO DMSO DNA DNAse dNTPs DTT <i>E. coli</i> EDTA EDTA et al.	counts per minuteCarboxyterminus eines ProteinsDesoxycytidintriphosphatDulbecco's Modified Eagle's MediumDimethylsulfoxidDesoxyribonukleinsäureDesoxyribonukleaseDesoxynukleosidtriphosphatDithiothreitolEscherichia coliEthylendiamintetraessigsäureet alii, et aliae oder et aliaEthanol
cpm C-Terminus dCTP DMEM DMSO DMSO DNA DNAse dNTPs DTT <i>E. coli</i> EDTA <i>et al.</i> EtOH	counts per minuteCarboxyterminus eines ProteinsDesoxycytidintriphosphatDulbecco's Modified Eagle's MediumDimethylsulfoxidDesoxyribonukleinsäureDesoxyribonukleaseDesoxynukleosidtriphosphatDithiothreitolEscherichia coliEthylendiamintetraessigsäureet alii, et aliae oder et aliaEthanolfemto- (10 ⁻¹⁵)

Frag.	Fragment
G	Guanin
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IC ₅₀	Antagonistenkonzentration mit halbmaximaler Wirkung
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
ISH	in situ-Hybridisierung
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
1	Liter
LB	Luria Broth
m	milli- (10 ⁻³)
М	Molarität
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	nano- (10 ⁻⁹)
NCBI	National Center for Biotechnology Information, USA
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen
р	piko- (10 ⁻¹²)
$pBKS^+$	pBluescript KS ⁺
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	Pyrococcus furiosus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Zimmertemperatur
S	Sekunde
S	sense (Oligonukleotid)
S.cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
SDS	Natriumdodecylsulfat
Seq.	Sequenzierung
Т	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
ТМ	Transmembrandomäne
Tris	Tris-hydroxymethyl-Aminomethan
Trx	Thioredoxin
u	unit (Einheit für die spezifische Enzymaktivität)
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
Х	beliebige Aminosäure (in einem Proteinmotiv)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-galaktopyranosid
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
YTH	yeast two-hybrid

Des weiteren werden für die Namen der Aminosäuren die etablierten Drei-Buchstabenund Ein-Buchstaben-Abkürzungen verwendet (Sambrook et al., 1989).

1.2 Der BK-Kanal

Die Klonierung eines BK-Kanals erfolgte zuerst aus Drosophila (Atkinson et al., 1991; Adelman et al., 1992); Ausgangspunkt war die Mutante Slowpoke (Elkins et al., 1986), daher die häufig anzutreffende Abkürzung Slo. In der Folgezeit wurden zu dSlo homologe Gene auch in anderen Spezies identifiziert, z.B. der Maus, der Ratte und dem Menschen (Butler et al., 1993; Tseng-Crank et al., 1994; Hülsemann, 1998). Ein BK-Kanal hat bei symmetrischer K^+ -Konzentration eine Leitfähigkeit von ca. 250 pS (Wallner et al., 1999a). Die membranspannende Region S1 - S6 des BK ist zu den spannungsaktivierten Kaliumkanälen homolog; BK verfügt jedoch über eine weitere N-terminale Transmembrandomäne (S0) und einen über 800 Aminosäuren langen intrazellulären C-Terminus, der weitere hydrophobe Segmente (S7 - S10) enthält (Adelman et al., 1992; Butler et al., 1993; Meera et al., 1997). Während an die SK-Kanäle konstitutiv Calmodulin als Ca²⁺-Sensor gebunden ist (Xia et al., 1998a), wurde beim BK-Kanal ein Sequenzabschnitt im C-Terminus identifiziert, der aufgrund der vielen negativ geladenen Aspartatreste eine potentielle Ca²⁺-Bindungsstelle darstellt und an der Regulation des Kanals durch Ca²⁺ einen wesentlichen Anteil hat. Die Region wird als "calcium bowl" bezeichnet und befindet sich zwischen S9 und S10 (Schreiber und Salkoff, 1997; Schreiber et al., 1999).

Obwohl nur ein Gen bekannt ist, das für die α -Untereinheit von BK-Kanälen kodiert, wurden native BK-Kanäle mit sehr unterschiedlicher Ca²⁺-Sensitivität, Kinetik und Sensitivität gegenüber Toxinen beschrieben (Reinhart *et al.*, 1989; McManus, 1991). Ein bedeutsamer Mechanismus, um BK-Kanäle mit variablen Eigenschaften zu erzeugen, ist das alternative Spleißen an mindestens 5 Stellen innerhalb des intrazellulären C-Terminus des BK-Kanals von Säugetieren (Butler *et al.*, 1993; Tseng-Crank *et al.*, 1994; Vogalis *et al.*, 1996; Wallner *et al.*, 1999a). Bei Spleißvarianten wurde eine veränderte apparente Ca²⁺-Sensitivität (Tseng-Crank *et al.*, 1994) bzw. durch ein cysteinreiches Exon eine erhöhte apparente Ca²⁺-Sensitivität und eine veränderte Kinetik beobachtet (Saito *et al.*, 1997). Darüber hinaus tragen β -Untereinheiten, Proteine mit zwei Transmembrandomänen und intrazellulären N- und C-Termini, zur Vielfalt nativer BK-Känale bei. Die erste β -Untereinheit wurde als Bestandteil des gereinigten BK-Kanals aus der glatten Muskulatur identifiziert und kloniert (Knaus *et al.*, 1994). Diese Untereinheit, die überwiegend in der glatten Muskulatur exprimiert wird, erhöht die Ca²⁺- und Iberiotoxin-Sensitivität und verlangsamt die Kinetik der Aktivierung und Deaktivierung des BK-Kanals (Dworetzky *et al.*, 1996). Für die Vermittlung des Effekts der β -Untereinheit ist die N-terminale Region des BK-Kanals bis einschließlich S0 erforderlich (Wallner *et al.*, 1996). Koexpression von BK mit einer anderen β -Untereinheit (β 2; Wallner *et al.*, 1999b; Xia *et al.*, 1999) führt dazu, daß der Kanal inaktivierend und außerdem sensitiver gegenüber Charybdotoxin wird (IC₅₀(α) = 1 nM; IC₅₀(α + β 2) = 58 nM; Wallner *et al.*, 1999b). In den Haarzellen des Innenohrs des Huhnes wirken alternatives Spleißen der α -Untereinheit und eine β -Untereinheit zusammen, um BK-Kanäle mit verschiedener Kinetik und Ca²⁺-Sensitivität zu generieren. Es wird vermutet, daß die unterschiedliche Verteilung von BK-Spleißvarianten und die Variationen im Expressionsniveau der β -Untereinheit in der Cochlea dazu dienen, die elektrischen Eigenschaften der verschiedenen Haarzellen an die Schallfrequenz, die sie verstärken sollen, anzupassen (Navaratnam *et al.*, 1997; Ramanathan *et al.*, 1999).

1.3 Physiologische Funktionen des BK-Kanals

Da unter physiologischen Bedingungen gleichzeitig ein depolarisiertes Membranpotential und eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erforderlich sind, um BK zu aktivieren (Marty, 1981), fungiert der Kanal in der Zelle als ein Koinzidenzdetektor. Seine Aktivierung repolarisiert die Plasmamembran, wodurch u.a. der Calciumeinstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (Ca_{v} -Kanäle) beendet wird, ein Vorgang, der in der Kybernetik als negative Rückkopplung bezeichnet wird (Vergara et al., 1998). Eine Aktivierung von BK-Kanälen durch Ca²⁺-Kanäle des N-Typs, aber nicht durch solche des L- oder P/Q-Typs, wurde mit patch clamp-Messungen an Hippocampus-Neuronen gezeigt (Marrion und Tavalin, 1998). In SCG-Neuronen sind BK-Kanäle hingegen mit Ca²⁺-Kanälen des L-Typs gekoppelt (Davies et al., 1996). BK-Kanäle tragen zur Repolarisierung nach einem Aktionspotential sowie zum schnellen hyperpolarisierenden Nachpotential (fAHP) bei (Storm, 1987; Sah, 1996). Sie regulieren die Ausschüttung von Neurotransmittern an der neuromuskulären Synapse des Frosches (Robitaille und Charlton, 1992). Aus den Ergebnissen der Immunhistochemie und in situ-Hybridisierung wurde abgeleitet, daß im zentralen Nervensystem der Ratte viele BK-Kanäle in den Axonen und Nervenendigungen lokalisiert sind, und es wird vermutet, daß präsynaptische BK-Kanäle im Gehirn ebenfalls an der Regulation der Neurotransmitter-Ausschüttung beteiligt sein könnten (Knaus et al., 1996).

BK-Kanäle sind in der glatten Muskulatur stark exprimiert (Knaus *et al.*, 1995) und spielen hier eine wichtige Rolle bei der Regulation des Kontraktionszustandes (Wallner *et al.*, 1999a). Die Blockierung der BK-Kanäle führt zur Depolarisierung der Muskelzellen und zur Kontraktion des Muskels (Brayden und Nelson, 1992; Anwer *et al.*, 1993). In der glatten Muskulatur von Arterien können BK-Kanäle infolge von lokalen Erhöhungen der Ca²⁺-Konzentration aktiviert werden, die von Ca²⁺-abhängigen Ca²⁺-Kanälen im sarkoplasmatischen Retikulum verursacht werden, und so die Zellen hyperpolarisieren und den Muskel entspannen (Nelson *et al.*, 1995)

1.4 Potentielle Interaktionspartner des BK-Kanals von Säugetieren

Die präzise Lokalisierung von Ionenkanälen in der Plasmamembran, z.B. im Verbund mit anderen Ionenkanälen, in der Prä- oder Postsynapse, ist für deren Funktion in vivo essentiell, und wird meist durch deren direkte Interaktion mit Struktur- oder Adapterproteinen erreicht (Sheng und Wyszynski, 1997). Die hohen Ca²⁺-Konzentrationen (im mikromolaren Bereich), die für die Aktivierung des BK-Kanals unter physiologischen Bedingungen erforderlich sind, deuten darauf hin, daß sich BK- und spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle in großer Nähe zueinander befinden sollten. Darüber hinaus zeigten *patch clamp*-Messungen an Neuronen des Hippocampus, daß im gleichen *patch* befindliche Ca²⁺-Kanäle des L-Typs und BK-Kanäle nahezu zeitgleich aktivieren, was ebenfalls auf einen sehr geringen Abstand zwischen den Kanälen schließen läßt (Marrion und Tavalin, 1998). Eine Kolokalisierung von BK-Kanälen und spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen wurde auch in Neuronen der Schnecke (Gola und Crest, 1993), an der neuromuskulären Synapse des Frosches (Robitaille et al., 1993) und in Haarzellen des Frosches nachgewiesen (Roberts et al., 1990; Issa und Hudspeth, 1994). Unbekannt sind jedoch die molekularen Strukturen, die für die räumliche Organisation dieser Ionenkanäle verantwortlich sind.

Bei der elektrophysiologischen Charakterisierung nativer BK-Kanäle aus dem Gehirn der Ratte wurde festgestellt, daß Proteinkinase C sowie die Phosphoprotein-Phosphatase 2A mit dem gereinigten Kanal assoziiert sind (Chung *et al.*, 1991; Reinhart und Levitan, 1995). Des weiteren können sowohl die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A als auch die Tyrosinkinase Src den BK-Kanal aus *Drosophila* nicht nur phosphorylieren, sondern auch physikalisch mit ihm interagieren (Wang *et al.*, 1999). Außerdem wurden mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems in der Hefe ("*yeast two-hybrid screen*") zwei bis dahin unbekannte, regulatorische Proteine gefunden (Slob und dSlip), die mit dem BK-Kanal aus *Drosophila* interagieren (Schopperle *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 1998b). Während Slob allein die Sensitivität von BK gegenüber der Depolarisation des Membranpotentials erhöht, kehrt die Assoziation eines weiteren regulatorischen Proteins, einer 14-3-3-Isoform, mit Slob den Effekt um und erhöht die Spannungssensitivität des Kanals (Zhou *et al.*, 1999). Die Bindung von 14-3-3 an Slob ist dynamisch regulierbar, da sie von der Phosphorylierung zweier Serinreste in Slob durch die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II abhängt (Zhou *et al.*, 1999). Allerdings konnten bis heute keine zu Slob oder dSlip homologen Vertebraten-Proteine gefunden werden.

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Bisher sind, mit Ausnahme der β -Untereinheiten, keine Proteine bekannt, die mit dem BK-Kanal von Vertebraten physikalisch interagieren. Nicht nur die in den letzten Jahren herausgearbeiteten Prinzipien der Signalübertragung und der räumlichen Organisation der Zelle, sondern auch das Beispiel des BK-Kanals aus *Drosophila* und die erwähnten experimentellen Befunde bezüglich des homologen Säugetier-Kanals lassen jedoch den Schluß zu, daß solche Interaktionspartner existieren und für die physiologischen Funktionen des Ionenkanals bedeutsam sind. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung eines bislang unbekannten Proteins, das mit dem C-Terminus des BK-Kanals der Ratte interagiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die Bezugsquellen der Materialien werden in der Reihenfolge Produktname, Firmenname angegeben.

2.1.1 Geräte

Blotapparatur	Trans-Blot SD, Bio-Rad
Elektroporator	Gene Pulser II, Bio-Rad
Entwicklungsmaschine	Curix 60, AGFA-Gevaert
Homogenisator	Schütt Labortechnik
Mikroskop	Axioskop, Zeiss
Mikroskop, konfokal	LSM 510 mit Axiovert 200, Zeiss
PCR	Trio-Thermoblock TB 1, Biometra
Photometer	GeneQuant RNA/DNA Calculator, Pharmacia
Phosphoimager	BAS 1500, Fujix, Raytest
Proteingelsystem	Mini-Protean II, Bio-Rad
Szintillationszähler	TRI-Carb 2000 CA, United Technologies Packard
	LS 6000LL, Beckman Coulter
Thermodrucker	Video Copy Processor P67E, Mitsubishi
Ultraschall-Gerät	Sonopuls GM 70, Bandelin Electronic
Ultra-Turrax	Janke & Kunkel, Ika-Labortechnik
Ultrazentrifugen	XL-90, Beckman
	Optima TLX 120, Beckman
Verstärkerfolie	Reflection, DuPont NEN
Zentrifugen	5415 C, Eppendorf (Tischzentrifuge)
	5402, Eppendorf (Kühlzentrifuge)
	Megafuge 2.0 R, Heraeus
	J2-MI, Beckman

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Chromatographie-Papier	3MM Chr, Whatman
Faltenfilter DNA-Isolation	Nucleobond, Macherey-Nagel
Filme	Kodak BIO-MAX ML, Eastman Kodak (Western)
	Kodak X-OMAT Blue XB-1 (Western)
	Kodak BIO-MAX MS (Northern)
Filter 0,22 µm	Stericup 500 ml, Millipore
Nitrozellulosemembranen	HyBond ECL, Amersham
	Protran BA 83, Schleicher & Schüll

2.1.3 Kits und Säulenmaterial

ECL-Detektionsreagenzien	Amersham
Gelextraktion	NucleoSpin Extract, Macherey-Nagel
	QiaEx II gel Extraction Kit, Qiagen
Glutathion-Agarose	Sigma
Kovalente Peptid-Kopplung	Sulfolink, Pierce
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen
Markierung von DNA	Rediprime RPN 1633, Amersham
Plasmid-DNA Isolation	NucleoSpin, Macherey-Nagel
	Wizard Plus MidiPreps, Promega
	Nucleobond PC 500, Macherey-Nagel
Proteinquantitierung	BCA Protein Assay Kit, Pierce
Gelfiltration	Sephadex G-50 Nick Column, Pharmacia
Sequenzierung	AmpliTaq FS 1/4 Big Dye Terminator,
	Applied Biosystems

2.1.4 Chemikalien

2.1.4.1 Chemikalien und Lösungen

A-, B-, L-, M-, H-Puffer	Roche
Acrylamidlösung (30 %; 37,5:1)	Bio-Rad
Agarose	Ultra Pure, Gibco BRL (DNA-Elektrophorese)
	SeaKem LE, Biozym (β-Galaktosidasetest)

3-Amino-1,2,4-triazol	Sigma
Ampicillin	Roche
Deoxycholat	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Fugene 6	Roche
Glutathion, reduziert	Sigma
ExpressHyb Hybridization Solution	Clontech
IPTG	Biomol
Lachssperma-DNA	Sigma
Lipofectamin, Lipofectin	Invitrogen
Paraformaldehyd	Sigma
Proteaseinhibitormischung	Complete Mini, Roche
SDS	Fluka
Szintillationsflüssigkeit	Rotiszint eco, Roth
Triton X-100	Fluka
Tween 20	Sigma
X-Gal	Biomol

Soweit nicht gesondert aufgeführt, wurden alle anderen Chemikalien von den Firmen Biomol, Fluka, Merck, Serva und Sigma bezogen.

2.1.4.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion, MWG Biotech und Eurogentec bezogen.

2.1.4.3 Längenstandards für DNA

Längenstandard DNA:	Gibco BRL
1 kb DNA-Leiter	12.216, 11.198, 10.180, 9.162, 8.144, 7.126, 6.108, 5.090, 4.072, 3.054, 2.036, 1.636, 1.018, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75 [bp]
1 kb+ DNA-Leiter	12.000, 11.000, 10.000, 9.000, 8.000, 7.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.000, 1.650, 1.000, 850, 650, 500, 400, 300, 200, 100 [bp]

100 bp DNA-Leiter	2.072, 1.500, 1.400, 1.300, 1.200, 1.100, 1.000, 900, 800,
	700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 [bp]

2.1.4.4 Längenstandards für Protein

Coomassie-Färbung:	SDS-PAGE Standard, low range 97,4; 66; 45; 31; 21,5; 14,5 [kDa]	Bio-Rad
Western Blot:	Precision Protein Standard, prestained 250; 150; 100; 75; 50; 37;25;15; 10 [kDa]	Bio-Rad

2.1.5 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden mit demineralisiertem H₂O angesetzt.

Ampicillinlösung	10	mg/ml	Ampicillin in H ₂ O
EDTA-Lösung	200	mM	EDTA (pH 8,0)
Ethidiumbromid-Lösung	10	mg/ml	Ethidiumbromid in H ₂ O
IPTG-Lösung	0,1	Μ	IPTG in H ₂ O, steril filtriert
PBS (1x)	130 7 3	mM mM mM	NaCl Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ (pH 7,3), autoklaviert
PBS-K (1x)	140 2,7 10 1,8	mM mM mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ (pH 7,3), autoklaviert
Phenol (TE-gesättigt)	0,1	%	Phenol p.A. mit TE-Puffer 8-Hydroxychinolin
TBS (1x)	140 20	mM mM	NaCl Tris-HCl (pH 8,0), autoklaviert
TE-Puffer (pH 7,5)	10 1	mM mM	Tris-HCl (pH 7,5) EDTA, autoklaviert
TE-Puffer (pH 8,0)	10 1	mM mM	Tris-HCl (pH 8,0) EDTA, autoklaviert
X-Gal	30	mg/ml	in DMSO

2.1.6 Nährmedien und Agarplatten

2.1.6.1 E.coli

LB-Medium	20	g/l	Miller's LB Broth Base, Gibco, autoklaviert
LB-Agarplatten	1	x	LB-Medium
	15	g/l	Bacto-Agar

Für die Antibiotika enthaltenden LB-Agarplatten wurde 100 μ g/ml Ampicillin nach dem Autoklavieren der 50 °C warmen 1 x LB-Agarlösung hinzugefügt.

2.1.6.2 S.cerevisiae

YAPD-Medium	10 20 0.1	g/l g/l g/l	Hefeextrakt Bactopepton Adenin
nach dem Autoklavieren:	100	ml	20% Glucose
Drop out-Medium	je 2 g je 1 g	g: 2:	Adenin, Arg, Cys Ile.Met, Phe. Pro. Ser, Tvr. Val:
	im M	lörser verme	engt
THULL -Medium	1,2	g/l	Yeast Nitrogene Base w/o amino acids (Difco)
	5	g/l	Ammoniumsulfat
	10	g/l	Succinat
	6	g/l	NaOH
	650	mg/l	Drop out-Medium
	210	mg/l	3-Aminotriazol
nach dem Autoklavieren:	100	ml	20% Glucose
	5	ml	Asp 10 g/l
	2,5	ml	Thr 40 g/l
UTL ⁻ -Medium	wie 7	THULL -Me	edium, jedoch zusätzlich:
	10	ml	Lys 10 g/l
	5	ml	His 10 g/l
	ohne		3-Aminotriazol
UT ⁻ -Medium	wie U	JTL ⁻ -Mediu	ım, jedoch zusätzlich:
	10	ml	Leu 10 g/l
UL ⁻ -Medium	wie U	JTL ⁻ -Mediu	ım, jedoch zusätzlich:
	10	ml	Trp 10 g/l

Für Nährmediumplatten wurden die entsprechenden Flüssigmedien wie oben angegeben angesetzt und vor dem Autoklavieren 16 g/l Bacto-Agar hinzugefügt.

2.1.6.3 Zellkultur

DMEM	Gibco BRL
Fötales Rinderserum	Gibco BRL
L-Glutamin 100x	Gibco BRL
Opti-MEM	Gibco BRL
Penicillin/Streptomycin 500x	Roche
Trypsin-EDTA	Gibco BRL
B27	Gibco BRL
bFGF	Gibco BRL
Hibernate A	Gibco BRL
Neurobasal A	Gibco BRL
Trypsin-EDTA	Biochrom

2.1.7 Plasmide

Bluesript II KS^+ , SK^+ , SK^-	Stratagene
pGEM-T	Promega
pGEX-4T	Pharmacia
pRSET	Invitrogen
pET32	Novagen
pLexN	Hollenberg et al., 1995
pVP16	Hollenberg et al., 1995
pGAD424	Clontech
pcDNA3	Invitrogen
pcDNA3.1/Myc-His	Invitrogen

2.1.8 Enzyme und Proteine

BSA, proteasefrei, Fraktion V	Sigma	
BSA, Standardlösung	Pierce	2 µg/µl
Ribonukleaseinhibitor (RNAsin)	Promega	40 u/µl
RNase A	Sigma	
RNase T ₁	Sigma	500 u/µl
MMLV Reverse Transkriptase		
SuperScript II (RNaseH ⁻)	Gibco BRL	200 u/µl
T4 DNA Ligase	Roche	1 u/µl
Taq-Polymerase	TaKaRa Ex Taq	5 u/µl
<i>Pfu</i> -Polymerase	Promega	3 u/µl

Die Restriktionsenzyme stammten von den Firmen New England Biolabs, Pharmacia oder Roche.

2.1.9 Antikörper

2.1.9.1 Erstantikörper

T7-Tag	monoklonal	Novagen
Thioredoxin ("anti-Thio")	monoklonal	Invitrogen
GST	monoklonal	Santa Cruz
c-myc (9E10)	monoklonal	Roche
NeuN	monoklonal	Chemicon
MAP2 (HM-2)	monoklonal	Sigma
BK-Kaliumkanal, aus Kaninchen	polyklonal	Chemicon

2.1.9.2 Zweitantikörper

Anti-Maus-IgG, aus Ziege	HRP-konjugiert	Bio-Rad
Anti-Kaninchen-IgG, aus Ziege	HRP-konjugiert	Bio-Rad
Anti-Maus-IgG, aus Ziege,	Cy3-konjugiert	Dianova
Anti-Kaninchen-IgG, aus Esel,	FITC-konjugiert	Amersham

2.1.10 Biologisches Material

2.1.10.1 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5a

[F⁻, *end*A1 *hsd*R17 ($r_k m_k$ ⁻), *sup*E44, *thi*1, *rec*A1, *gyr*A(Nal^r), *rel*A1, Δ (*lac*ZYA-*arg*F)U169, φ 80-d *lac*Z Δ M15]

Escherichia coli BL21

F, ompT, hsdS (r_B , m_B), gal

2.1.10.2 Hefestamm

Saccharomyces cerevisiae L40

MATa his3∆200 trp1-901 leu2-3112 ade2 LYS2::(4lexAop-HIS3) URA3::(8lexAoplacZ) GAL4 gal80

2.1.10.3 Ratten (Rattus norvegicus)

Männliche Wistar-Ratten der Alterstufen P20 bis P60. Trächtige Weibchen zur Präparation der Hippocampi aus E18-Embryonen.

2.2 Methoden

Als genereller Leitfaden für die experimentelle Arbeit dienten Sambrook *et al.* (1989) sowie Harlow und Lane (1999).

2.2.1 Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von DNA

2.2.1.1 Klonierungsmethoden

2.2.1.1.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Boehringer-Puffer (1x):

	Α	В	L	М	Н
Tris-Acetat	33	-	-	-	-
Tris-HCl	-	10	10	10	10
Mg-Acetat	10	-	-	-	-
MgCl ₂	-	5	10	10	10
K-Acetat	66	-	-	-	-
NaCl	-	100	-	50	100
DTE	-	-	10	10	10
DTT	0,5	-	-	-	-
2-ME	-	1	-	-	-

Zur Analyse der DNA aus 5 ml-Kulturen (2.2.1.2.4) wurde 1 μ l (entspricht 1/50 der gesamten DNA oder ca. 200 ng) des Eluats eingesetzt. Für präparative Zwecke wurden 1 - 2,5 μ g Plasmid-DNA oder das aus einem Agarosegel isolierte (2.2.1.1.4) PCR-Produkt verwendet, dessen Konzentration zuvor auf einem analytischen TBE-Agarosegel abgeschätzt worden war. Die erforderlichen Mengen der Restriktionsenzyme wurden berechnet und das Gesamtvolumen des Ansatzes so gewählt, daß die Glycerol-Endkonzentration 5 % (bei *EcoRI* und *BamHI* 2 %) nicht überschritt. Die Spaltung der DNA erfolgte bei 37 °C für mindestens 1 h. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/7 Volumen DNA-Probenpuffer beendet und die DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel (2.2.1.1.3) aufgetrennt.

2.2.1.1.2 Vektorpräparation

Zur Linearisierung von Plasmid-DNA, die für die Ligation eingesetzt werden sollte, wurden 1 - 2,5 μ g zirkuläre Vektor-DNA mit der zweieinhalbfachen der berechneten Menge an Restriktionsendonukleasen für 2 h bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von $50 - 100 \,\mu$ l inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 1/20 Volumen 1 M Tris-HCl pH 9,0 versetzt und die DNA mit 3 u Alkalischer Phosphatase pro pmol Enden dephosphoryliert. Man inkubierte exakt 1 h bei 37 °C und stoppte die Reaktion mit 1/7 Volumen DNA-Probenpuffer. Die Reinigung der Vektor-DNA erfolgte elektrophoretisch über ein 0,7 %iges Agarosegel. Anschließend wurde sie isoliert wie unter 2.2.1.1.4 beschrieben.

2.2.1.1.3 Elektrophoretische Trennung von DNA

DNA-Probenpuffer (5x):	20	%	Ficoll 400
	100	mM	EDTA (pH 8,0)
	0,25	%	Bromphenolblau
	0,25	%	Xylencyanol ff
TBE-Puffer (10x):	890	mM	Tris
	890	mM	Borsäure
	20	mM	EDTA (pH 8,0)

Zur Trennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele in horizontalen Gelkammern mit einem TBE-Puffersystem eingesetzt. Ethidiumbromid $(0,4 \ \mu g/ml)$ befand sich sowohl im Gel als auch im Laufpuffer. Die Agarosekonzentration betrug 0,7 - 1,5 %, abhängig von der Größe der zu separierenden DNA-Fragmente. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt und die DNA-Banden unter UV-Licht visualisiert und dokumentiert.

2.2.1.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für präparative Zwecke wurde die gesuchte DNA-Bande unter langwelligem UV-Licht (366 nm) aus dem Agarosegel mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA aus dem Gelfragment kam das "NucleoSpin Extract"-System zum Einsatz. Die Agarose wurde mit NT1-Puffer ($300 \mu l / 100 \mu g$ Gel) bei 50 °C unter Schütteln für 10 min aufgelöst und die Lösung auf die mitgelieferte Säule geladen (Zentrifugation: Eppendorf-Tischzentrifuge, 8000 x g, 1 min). Man wusch die Säule zweimal mit je 600 μl NT3-Lösung (Zentrifugation: Eppendorf-Tischzentrifuge, 15800 x g, 1 min) Nach dem zweiten Waschschritt folgte noch eine abschließende Zentrifugation bei 15800 x g für 2 min, um Reste der NT3-Lösung zu entfernen. Die DNA wurde mit 30 μl NE-Puffer eluiert, der auf 70 °C vorgewärmt worden war.

Da das System von Macherey-Nagel bei DNA-Fragmenten, die kleiner als 200 bp waren, geringe Ausbeuten lieferte, wurde in diesen Fällen das "Qiaex II"-System verwendet. Die erforderliche Menge an QX1-Puffer wurde nach den Angaben des Herstellers bestimmt und dem Ansatz aus QX1-Puffer und DNA-haltigem Agaroseblock 10 µl QiaexII-Suspension hinzugefügt. Solubilisieren der Agarose und Adsorption der DNA erfolgten für 10 min bei 50 °C. Danach zentrifugierte man für 30 s bei 13600 x g und wusch das Sediment nacheinander mit 500 µl QX1-Puffer und zweimal mit je 500 µl PE-Puffer. Das Sediment wurde im Stickstoffstrom so lange getrocknet, bis es eine weiße Farbe annahm. Anschließend wurde die DNA mit 20 µl 5 mM Tris-HCl pH 8,0 eluiert.

2.2.1.1.5 Klonierung eines HA-Epitops in den Expressionsvektor pcDNA3

Der Expressionsvektor pcDNA3 wurde zunächst mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *ApaI* geschnitten und gereinigt wie unter 2.2.1.1.2 beschrieben, jedoch nicht dephosphoryliert. Je 80 pmol der Oligonukleotide 1873 (*sense*) und 1874 (*antisense*; s. Anhang) wurden in 40 μ l Endvolumen mit 1 x "One for All"-Puffer (Pharmacia) vermischt und 5 min in einem kochenden Wasserbad (ca. 0,5 l) inkubiert. Zu langsamen Abkühlung wurde die DNA-Lösung im Wasserbad belassen und dieses im Verlauf mehrerer Stunden auf RT abgekühlt. 100 fmol, 50 fmol und 10 fmol des doppelsträngigen Oligonukleotids wurden für die Ligation eingesetzt (2.2.1.2.2).

2.2.1.2 DNA-Amplifikation in Bakterien

2.2.1.2.1 Herstellung kompetenter E.coli DH5a

(Inoue *et al.*, 1990)

SOB-Medium:	20	g/l	Bacto-Trypton
	5	g/1	Hefeextrakt
	10	mМ	NaCl
	5	mМ	KCl
	10	mМ	MgCl ₂
	10	mМ	$MgSO_4$
	(pH	7,0 einge	estellt)
TB-Medium:	10	mМ	MOPS, pH 6,7 mit KOH
	250	mМ	KCl
	15	mМ	CaCl ₂
	55	mМ	MnCl ₂

Um die Bakterien für die Aufnahme von Plasmid-DNA vorzubereiten, wurden sie der folgenden Prozedur unterzogen: Die Bakterien wurden in 250 ml SOB-Medium bei 18 °C und unter Schütteln (220 rpm) bis zu einer OD_{600} von 0,45 - 0,6 herangezogen. (Die gewünschte Dichte der Kultur war, wenn mit 10 Kolonien angeimpft worden war, nach etwa 40 - 48 h erreicht.) Die Kultur wurde anschließend für 10 min auf Eis gestellt und danach die Zellen bei 2500 x g sedimentiert (Beckman-Rotor JS-7.5; 10 min, 4 °C). Die Bakterien wurden in 80 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut sedimentiert. Diesmal suspendierte man die Zellen mit 20 ml eiskaltem TB-Medium, fügte DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % (1,5 ml; unter Schutzgas gelagert; Sigma) hinzu und inkubierte wieder für 10 min auf Eis. Die Bakteriensuspension wurde in 100 µl-Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2.2 Ligation

Ligationspuffer (5x):	100	mМ	Tris-HCl (pH 7,5)
	50	mМ	MgCl ₂
	50	mМ	DTT
	5	mМ	ATP

Für einen Standardansatz wurden $10-15 \mu g$ geschnittener, dephosphorylierter und gereinigter Vektor und ein dreifacher molarer Überschuß des zu ligierenden DNA-Fragmentes in 1x Ligationspuffer mit 1 u T4-DNA-Ligase (Roche) in einem Gesamtvolumen von 20 μ l gemischt. Die Ligation erfolgte für mindestens 2 h bei 14°, wonach die Transformation stattfinden konnte.

Um die Produkte der PCR mit "TaKaRa Ex Taq" Polymerase auf Erststrang-cDNA (2.2.1.3) in den Vektor pGEM-T (Promega) einzubauen, wurden die von Hersteller mitgelieferten Reagenzien verwendet. Der Ligationsansatz wurde für 1 h bei RT inkubiert und dann die Transformation durchgeführt.

2.2.1.2.3 Transformation von E. coli

Die Amplifikation von DNA erfolgte in *E.coli* DH5 α . Zur Transformation wurde ein Aliquot der kompetenten Bakterien zu 5 µl des Ligationsansatzes gegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden einem Hitzeschock bei 37 °C für 5 min ausgesetzt, 150 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) hinzugefügt und für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf einer vorgewärmten (37 °C)

LB/Amp-Platte ausgestrichen und die Bakterien über Nacht im Brutschrank bei 37 °C herangezogen.

Für die "Blau/Weiß"-Selektion der erfolgreich transformierten Bakterienkolonien, die im Falle der Klonierung von PCR-Produkten in den pGEM-T-Vektor angewendet wurde, wurden die LB/Amp-Platten vor dem Ausstreichen der Bakterien bei 37 °C vorgewärmt und eine Mischung von 10 μ l IPTG (100 mM) und 40 μ l X-Gal (30 mg/ml) auf der Platte verteilt. Nach 15 min bei 37 °C konnte die Transformation ausplattiert werden.

2.2.1.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Flüssigkulturen

(Birnboim und Doly, 1979)

Isolierung von Plasmid-DNA aus 5 ml-Kulturen

Die Anzucht der Bakterien aus einer einzelnen Kolonie erfolgte über Nacht bei 37 °C unter kräftigem Schütteln (220 rpm) in 5 ml LB/Amp-Medium. Man sedimentierte die Bakterien bei 6200 x g für 3 min bei RT (Megafuge) und verwarf das überstehende Medium. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde mit dem "NucleoSpin"-System nach dem detaillierten Protokoll des Herstellers durchgeführt. (Alle Zentrifugationen wurden bei 15800 x g in der Tischzentrifuge durchgeführt.) Zur Elution der DNA wurde auf 70 °C vorgewärmter 5 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 verwendet.

Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von ca. 300 µg DNA wurde als Standardverfahren das "Wizard Plus Midipreps"-System verwendet. Die so präparierte DNA diente u.a. der Transformation von Hefezellen.

Man startete mit einer einzelnen Bakterienkolonie eine Übernachtkultur in 70 ml LB/Amp-Medium (37°/220 rpm) und sedimentierte die Bakterien am nächsten Tag bei 6200 x g für 10 min (Megafuge). Die Isolierung der DNA erfolgte nach der Anleitung des Herstellers, bis auf die folgenden, geringfügigen Änderungen:

- Das Bakterienlysat wurde mittels Zentrifugation (6200 x g, 15 min, 4 °C) und anschließender Filtration (Faltenfilter) geklärt;
- Der TE-Puffer wurde f
 ür die Elution der DNA auf 70° vorgewärmt, um die Ausbeute zu steigern.
- Eine abschließende Zentrifugation des Eluats war nicht erforderlich.

Isolierung von Plasmid-DNA für die Transfektion von Säugerzellen

Die Effizienz der Transfektion von Zellkulturen (z.B. COS-7 oder HEK293) hängt auch von der Reinheit der verwendeten DNA ab. Daher kam für diese Anwendungen das "Nucleobond PC 500"-System zum Einsatz.

150 ml LB/Amp-Medium wurden mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden sedimentiert (Beckman-Rotor JS-7.5, 10400 x g, 10 min, 4 °C) und die DNA entsprechend dem Protokoll der Firma Macherey-Nagel isoliert. (Das Bakterienlysat wurde durch Zentrifugation bei 4° und anschließendes Filtrieren durch einen Faltenfilter geklärt.) Die DNA wurde aus 15 ml Elutionspuffer "N5" durch Zugabe von 0,75 Volumen 2-Propanol ausgefällt, sedimentiert und mit kaltem (4 °C) 75 % Ethanol gewaschen. Um das Ethanol zu entfernen, wurde das DNA-Sediment kurz im Vakuum getrocknet und mit sterilfiltriertem Wasser aufgenommen, sodaß eine Endkonzentration von 1 μ g/ μ l DNA vorlag.

Reinigung von Plasmid-DNA mittels CsCl-Gradientenzentrifugation

Lösung I:	50	mM	Glucose
	25	mM	Tris-HCl pH 8,0
	10	mM	EDTA
Lösung II:	0,2	M	NaOH
	1	%	SDS
Lösung III:	125 75 50 pH =	ml ml 4,8 einge	K-Acetat 5 M Eisessig Wasser; estellt

Lysozym-Lösung: 10 mg/ml in Lösung I

Diese Methode wurde angewendet, um besonders reine "super-coiled" DNA für die Transfektion von Zellkulturen zu gewinnen. Die sedimentierten Bakterien aus einer 500 ml-Kultur (Beckman-Rotor JS-7.5, 10400 x g, 12 min, 4 °C) wurden in 27 ml Lösung I aufgenommen und 3 ml Lysozym-Lösung zugegeben. Nach zehnminütiger Inkubation bei RT wurden nacheinander 60 ml Lösung II und 45 ml eiskalte Lösung III hinzugefügt und der Ansatz jeweils gründlich gemischt. Es wurde 20 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (Beckman-Rotor JS-7.5, 10400 x g, 15 min, 4 °C) und filtriert. Die Nucleinsäuren wurden mit 81 ml 2-Propanol bei -20 °C gefällt (20 min) und sedimentiert (10400 x g, 15 min, 4 °C). Das Präzipitat wurde in 7,5 ml TE (pH 8,0) aufgenommen und RNA durch Zugabe von 2,5 ml 10 M Ammoniumacetat auf Eis gefällt (30 min). Es wurde erneut zentrifugiert (6200 x g, 10 min, 4 °C) und mit dem Überstand eine Ethanolfällung durchgeführt (30 min, auf Eis). Nach erneuter Zentrifugation wurde die rohe DNA in 300 µl Wasser aufgenommen. Die RNA-Verdauung wurde in Gegenwart von 1/10 Volumen 0,2 M EDTA, 10 µl RNase A-Lösung (1 µg/µl) und 1000 u RNase T₁ für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurde viermal mit 1 Vol. Phenol und einigen Tropfen Chloroform extrahiert und abschließend einmal mit 1 Vol. Chloroform extrahiert. Die DNA wurde mit 1/10 Vol. 10 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen Ethanol gefällt und 5 min bei RT zentrifugiert (Tischzentrifuge, 15800 x g). Der Niederschlag wurde in 4 ml TE gelöst, sowie mit 4 g CsCl und 200 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt. Der Dichtegradient wurde in der Ultrazentrifuge (Beckman NVT 90-Rotor) unter mit dem ESP-Programm der Zentrifuge berechneten Bedingungen erzeugt. Die untere DNA-Bande wurde unter langwelligem UV-Licht (366 nm) mit einer Spritze entnommen. Das Ethidiumbromid wurde mit 1 Vol. 2-Butanol, das mit 5 M NaCl gesättigt war, aus der wässerigen Phase extrahiert, bis die organische Phase klar blieb; danach wurden zwei weitere Extraktionen durchgeführt. Anschließend wurde die DNA-haltige Lösung mit 3 Vol. Wasser verdünnt und die DNA durch Zugabe von 2,5 Vol. Ethanol für 4 h oder über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Die DNA wurde mit 75 % Ethanol gewaschen, kurz im Vakuum getrocknet und mit sterilfiltriertem Wasser aufgenommen, sodaß eine Endkonzentration von $1 \,\mu g/\mu l$ vorlag.

2.2.1.3 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Saiki et al., 1988)

Standard-Amplifikationen von DNA-Fragmenten aus linearisierter Plasmid-DNA erfolgten mit der *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*. Die *Primer* enthielten die für die Klonierung benötigten Schittstellen von Restiktionsendonukleasen. Die Standardbedingungen der PCR waren für alle *Primer*: Denaturierung: 95 °C für 1 min; Anlagerung der Oligonukleotide: 45 °C für 1 min; Elongation: 72 °C für 1 min pro 1 kb zu amplifizierender Sequenz; 20 Zyklen und danach ein siebenminütiger Elongationsschritt (72 °C).

Für die Amplifikation von Sequenzen aus Erststrang-cDNA wurde die "TaKaRa Ex Taq"-Polymerase eingesetzt. Für einen Reaktionsansatz (50 μl Endvolumen) wurden 1 μl Erststrang-cDNA, 1,5 u "TaKaRa Ex Taq", je 0,2 mM dNTPs und je 1 μM *Primer* in "Ex Taq"-Puffer (1x) eingesetzt. Die PCR-Bedingungen waren in diesem Fall: Denaturierung: 95 °C für 1 min ; Anlagerung der Oligonukleotide: X °C für 1 min; Elongation: 72 °C, für 1 min pro 1 kb zu amplifizierender Sequenz; 30 Zyklen und danach ein siebenminütiger Elongationsschritt (72 °C). Den Zyklen ging ein einmaliger zweiminütiger Denaturierungsschritt bei 95 °C voraus, wonach die Polymerase hinzugefügt wurde.

Die Hybridisierungstemperatur "X" wurde ermittelt, indem von der Schmelztemperatur T_M des schwächer bindenden *Primers* 2-3 °C subtrahiert wurde. Die Schmelztemperatur der Oligonukleotide wurde näherungsweise berechnet nach:

$$T_{M} = 4 x (GC) + 2 x (AT)$$

Die genannten PCR-Bedingungen gelten für die PCR-Maschine "Trio-Thermoblock" der Firma Biometra.

2.2.1.4 PCR-Sequenzierung mit fluoreszierenden Terminatoren

(Sanger et al., 1977)

Die PCR-Sequenzierung von DNA wurde mit der "Terminator Ready"-Reaktionsmischung aus dem "AmpliTaq FS 1/4 Big Dye Terminator"-System durchgeführt. Zur Sequenzierung der EDTA-freien Plasmid-DNA (0,2 - 0,5 μ g pro Ansatz) wurden 4 μ l des "Terminator Ready Mix" und 3,2 pmol Oligonukleotid in 20 μ l Endvolumen verwendet. Die PCR-Bedingungen für die Sequenzierungreaktion im "Trio-Thermoblock" waren: Denaturierung: 96 °C für 30 s; Anlagerung des Oligonukleotids: 50 °C für 15 s; Elongation: 60 °C für 4 min; 25 Zyklen. Danach wurde die Reaktionsmischung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,6) angesäuert und die amplifizierte DNA mit 50 μ l absolutem Ethanol ausgefällt (10 min Inkubation auf Eis). Die DNA wurde bei 15800 x g sedimentiert (15 min, RT), mit 250 μ l 75 % Ethanol gewaschen, erneut für 5 min zentrifugiert und kurz im Vakuum getrocknet. Frau M. Praetor und Dr. S. Barnikol-Watanabe führten die Gelelektrophorese der fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte und die Bestimmung der DNA-Sequenz durch.

2.2.2 Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von RNA

2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus neuronalem Gewebe

(Chomczynski et al., 1987)

Lösung D: 4 M Guanidiniumthiocyanat 25 mM Na-Citrat, pH 7 0,5 % Sarkosyl 0,1 M 2-Mercaptoethanol

Adulte, männliche (P23) Sprague-Dawley-Ratten wurden anästhesiert, dekapitiert, die oberen Zervikalganglien (auch SCG abgekürzt) präpariert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Gewebe wurde bis zur Isolierung der RNA bei -80 °C gelagert. Zwei Ganglien wurden in 80 μl Lösung D zuerst mit einem Mikropistill in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß und anschließend mit einer Kanüle (29G) homogenisiert, mit 1/10 Vol. 2 M Na-Acetat (pH 4), 1 Vol. Phenol und 1/5 Vol. Chloroform versetzt und für 1 min gut durchmischt ("Vortex", maximale Geschwindigkeit). Nach 15minütiger Inkubation auf Eis wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt (10000 x g, 20 min, 4 °C). Die in der wäßrigen Phase enthaltene RNA wurde mit 1 Vol. 2-Propanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Die sedimentierte RNA wurde mit 75 % Ethanol gewaschen, kurz im Vakuum getrocknet und in 10 μl Wasser aufgenommen. Die Gesamtausbeute wurde photometrisch bestimmt und betrug 3 μg RNA.

2.2.2.2 cDNA-Erststrangsynthese

Erststrangpuffer (5x):	250	mМ	Tris-HCl (pH 8,3)
(Gibco BRL)	375	mМ	KCl
	15	mМ	$MgCl_2$

Die Synthese von Erststrang-cDNA wurde mit RNA-abhängiger DNA-Polymerase ("SuperScript II") unter Verwendung von Zufalls-*Primern* durchgeführt. Je 1,5 µg aus den oberen Zervikalganglien isolierte Gesamt-RNA wurden für die cDNA-Synthese und für den Kontrollansatz ohne Enzym verwendet.

Pro Ansatz wurden 1 mM dNTP's, 50 ng "random hexamer"-Oligonukleotide, 20 u RNAsin sowie 200 u "Superscript II" Reverse Transkriptase in 1 x Puffer mit 10 mM DTT eingesetzt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei RT erfolgte die Erststrangsynthese bei 42 °C für 50 min und eine abschließende Inkubation bei 72 °C für 10 min.

2.2.2.3 Detektion von immobilisierter RNA (Northern Blot)

2.2.2.3.1 Radioaktive Markierung von DNA

Ein DNA-Fragment wurde mit *Sal I* und *Nsi I* aus pVP16-N11-1 geschnitten, der Elektrophorese unterzogen und aus dem Agarosegel isoliert. Von dieser Matritze wurden mit Hilfe des "Rediprime II"-Systems unter Verwendung von Zufalls-*Primern* komplementäre, α^{32} P-dCTP-markierte DNA-Sonden hergestellt.

25 ng DNA wurden in 50 µl bei 100 °C für 5 min denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die abgekühlte DNA wurde zum "Rediprime II"-Mix gegeben und die Markierung erfolgte mit 50 µCi α^{32} P-dCTP (Amersham) für 1 h bei 22 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA-Stammlösung (pH 8) beendet. Die Trennung der DNA-Sonden von freien Nukleotiden erfolgte mittels einer Gelfiltration ("Nick-Column"), wobei je 4 - 5 Tropfen des Eluats in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen und die 3 Fraktionen mit der höchsten Aktivität vereinigt wurden. Zur Bestimmung der eingebauten Aktivität wurde die Cerenkow-Strahlung von 1 µl markierter DNA mit Hilfe eines Szintillationszählers gemessen. Die Gesamtaktivität der markierten DNA betrug 55 x 10⁶ cpm.

2.2.2.3.2 Hybridisierung

Der *Northern Blot* mit immobilisierter polyA⁺-RNA aus verschiedenen Geweben der Ratte wurde von Clontech bezogen. Die Vorhybridisierung der Membran erfolgte mit 10 ml "ExpressHyb"-Lösung für 1 h bei 68 °C. Von der denaturierten DNA-Sonde wurden insgesamt 20 x 10⁶ cpm in 10 ml "ExpressHyb"-Lösung für die Hybridisierung (1 h bei 68 °C) eingesetzt.

Um die Waschbedingungen zu ermitteln, die erforderlich waren, um die Spezifität der *Northern*-Analyse für BKAP-Transkripte zu gewährleisten, wurde die Schmelztemperatur T_m (in °C) der Sonde wie folgt berechnet:

 $T_m = 81,5 + 16,6(\log M) + 0,41(\% G+C),$

wobei M die Molarität der einfach geladenen Kationen ist (Anderson und Young, 1985). Pro 1 % Abweichung der hybridisierten Sequenzen reduziert sich die T_m um

0,5 - 1,4 % (Anderson und Young, 1985). Die Waschbedingungen waren wie folgt: einmal bei RT mit 2 x SET/0,3 % SDS (1 min); einmal für 5 min und einmal für 20 min bei 55 °C mit 2 x SET/0,3 % SDS; einmal für 20 min und einmal für 45 min in 0,1 x SET/0,3 % SDS. Beim letzten Waschschritt wurde die Temperatur sukzessive von 55 °C auf 65 °C erhöht. Die autoradiografische Detektion wurde mit Biomax MS-Filmen durchgeführt, die für 6 h und für 18 h exponiert wurden.

2.2.3 Basismethoden der Biochemie

2.2.3.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Laemmli-Probenpuffer (2x):	125	mM	Tris-HCl pH 6,8
	5	%	SDS
	10	%	2-Mercaptoethanol
	15	%	Glycerol
Acrylamidlösung (37,5:1):	30	%	Acrylamid (w/v)
	2,6	%	N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)
Trenngelpuffer (4x):	1,5	M	Tris-HCl pH 8,8
	0,4	%	SDS (w/v)
Sammelgelpuffer (4x):	0,5	M	Tris-HCl pH 6,8
	0,4	%	SDS (w/v)
PAGE-Laufpuffer (1x):	14,4	g/l	Glycin
	3,0	g/l	Tris
	0,1	%	SDS
	(frisc	h aus	10x-Laufpuffer und 10 % SDS angesetzt)

Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden mit Laemmli-Probenpuffer (2x) versetzt und, wenn nicht anders angegeben, 5 min bei 95 °C denaturiert.

Die Experimente wurden mit den "Mini-Protean II"-Gelsystem mit selbst hergestellten Polyacrylamidgelen durchgeführt. Die Endkonzentration des Acrylamids im Trenngel betrug 5 %, 7,5 %, 12 % oder 15 %, abhängig vom Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine, und 3 % im Sammelgel. Für zwei Gele wurde 2,5 ml Trenngelpuffer (4x) mit den erforderlichen Mengen Acrylamidlösung und Wasser auf 10 ml Gesamtvolumen verdünnt und die Polymerisation durch Zugabe von 70 μ l 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat und 10 μ l TEMED gestartet. Das Trenngel wurde während der einstündigen Polymerisation mit Überschichtungslösung bedeckt. 5 ml Sammelgel wurden in gleicher Weise mit Sammelgelpuffer (4x) angesetzt, die Teflonkämme eingesetzt und mindestens 30 min polymerisiert. Die Elektrophoresekammer wurde mit PAGE-Laufpuffer (1x) befüllt, und die Elektrophorese erfolgte bei konstant 80 V für das Sammel- und 160 V für das Trenngel.

2.2.3.2 Coomassie-Färbung

Färbelösung:	0,25	%	Coomassie Brilliant Blue R250 (w/v)
	45	%	Methanol (v/v)
	9	%	Eisessig (v/v)
Entfärber-1:	45	%	Methanol (v/v)
	7,5	%	Eisessig (v/v)
Entfärber-2:	10	%	Methanol (v/v)
	7,5	%	Eisessig (v/v)

Die Gele wurden 10-15 min in der Färbelösung, 15 min in Entfärber-1 und über Nacht unter leichtem Schütteln in Entfärber-2 inkubiert. Um die Gele zu archivieren, wurden sie kurz mit Wasser gewaschen und zwischen mit 2 % Glycerol befeuchteter Zellophanfolie (Novex) getrocknet.

2.2.3.3 Transfer und Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western Blot)

Anodenpuffer 1:	300	mМ	Tris-HCl pH 10,4
	10	%	Methanol
Anodenpuffer 2:	25	mM	Tris-HCl pH 10,4
	10	%	Methanol
Kathodenpuffer:	25	mМ	Tris-HCl pH 9,4
	40	mМ	6-Aminohexansäure
	10	%	Methanol

Das Methanol wurde den Elektrodenpuffern unmittelbar vor der Verwendung zugesetzt.

TBS-T:	20	mМ	Tris-HCl pH 7,5
	140	mМ	NaCl (autoklaviert)
	0,1	%	Tween 20 (w/v)

Western-Blockierlösung: TBS-T mit:

5 % Milchpulver (fettarm)5 % Ziegenserum

Der Transfer der Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham) erfolgte nach dem *Semi-dry*-Verfahren ("Trans-Blot SD"). Chromatographie-Papier wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten und auf der Anode in dieser Reihenfolge übereinandergeschichtet:

- 1) eine Lage Chromatographie-Papier, getränkt mit Anodenpuffer 1;
- 2) zwei Lagen Chromatographie-Papier, getränkt mit Anodenpuffer 2;
- 3) die Nitrozellulosemembran, zuvor mindestens 15 min gewässert;
- 4) das Polyacrylamidgel;
- 5) drei Lagen Chromatographie-Papier, getränkt mit Kathodenpuffer.

Schließlich wurde die Kathode aufgesetzt und die Proteine in 15-20 min bei 2,5 mA/cm² Gelfläche (105 mA für ein komplettes Minigel) auf die Membran übertragen. Das fragliche Protein wurde anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper und einem auf Chemilumineszenz basierenden Detektionssystem nachgewiesen. Alle Schritte erfolgten bei RT.

Die Membran wurde kurz in TBS (ohne Detergenz) gewaschen und 30 min in *Western*-Blockierlösung unter Schütteln inkubiert. Danach wurde für 2 h mit dem Erstantikörper, verdünnt in Blockierlösung, inkubiert. Es wurde dreimal 5 min mit Blockierlösung gewaschen und 45 min mit dem Zweitantikörper in Blockierlösung inkubiert. Es kamen Antikörper, die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt worden waren (Biorad), gegen IgG der Maus oder des Kaninchens zum Einsatz. Die Membran wurde viermal 5 min in TBS-T und kurz in TBS (ohne Detergenz) gewaschen. Gebundener Zweitantikörper wurde mit dem ECL-System von Amersham und "Biomax ML"- oder "X-OMAT Blue XB-1"-Filmen (Kodak) nachgewiesen. Die Autoradiogramme wurden direkt eingescannt.

2.2.3.4 Expression von rekombinanten Proteinen in Bakterien

Es wurden *E.coli* BL21(DE3) verwendet, die mittels Elektroporation transformiert wurden.

Die folgenden Expressionsvektoren kamen zum Einsatz:

• <u>pGEX-4T-1</u>: Kodiert für ein Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST), die sowohl für die Reinigung und Immobilisierung des Proteins an Glutathion-Agarose als auch für die Detektion genutzt wird.
- <u>pET32a</u>: Kodiert f
 ür ein Fusionsprotein mit Thioredoxin (Trx) und einem Polyhistidin-*Tag* f
 ür die Reinigung.
- <u>pRSET</u>: Kodiert für einen Polyhistidin-*Tag* und ein T7-Epitop, die zur Reinigung bzw. Detektion des Proteins genutzt werden.

2.2.3.4.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektroporation

Eine Bakterienkolonie wurde in 10 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Die Vorkultur wurde in 2 x 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 erreicht war. Die Bakterien wurden in sterile Zentrifugationsgefäße überführt und 20 min bei 4 °C und 1200 x g (Beckman-Rotor JS-7.5) zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde zunächst in 1 l eiskaltem dest. Wasser resuspendiert und wie oben zentrifugiert, und dann erneut in 0,5 l eiskaltem dest. Wasser resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterien mit 20 ml eiskaltem 10%igem Glycerol gewaschen, 15 min bei 1200 x g (Megafuge; 4 °C) zentrifugiert und in 3 ml eiskaltem 10%igem Glycerol aufgenommen. 100 μ l-Aliquots der Suspension wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.4.2 Elektroporation

25 μ l der für die Elektroporation präparierten *E.coli* BL21(DE3) wurden mit 1 μ l Plasmid-DNA vermischt und in eine auf 4 °C vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit einem "Gene Pulser II" mit den folgenden Einstellungen: Widerstand, 200 Ohm; Kapazität, 25 μ F; Spannung, 1,8 kV.

Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 15 min unter leichtem Schütteln (70 rpm) bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden in 1 ml TE-Puffer aufgenommen und 100 μ l der Suspension, sowie 100 μ l einer 1:10-Verdünnung, auf Nährmediumplatten mit Ampicillin ausgestrichen.

2.2.3.4.3 Anzucht von Bakterienkulturen für die Proteingewinnung

Eine Kolonie der transformierten Bakterien wurde in 20 ml LB/Amp-Medium über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Vorkultur wurde 1:50 (bei aufgrund der transformierten DNA langsam wachsenden Bakterien 1:30) in 500 ml LB/Amp-Medium verdünnt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch die Zugabe von IPTG bei 25 °C und einer OD_{600} der Kultur von 0,6. Für pET32-Vektoren wurde 1 mM IPTG (Endkonzentration) verwendet, für pGEX-Vektoren 0,1 mM IPTG. Bei den pRSET-Vektoren fand eine starke Expression des Fusionsproteins bereits ohne Induktion statt, und die Zugabe von IPTG führte zu keiner feststellbaren Zunahme der Proteinsynthese. Die Bakterien wurden weiterhin bei 25 °C unter Schütteln für 3 bis 5 h inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 2 bis 3,5 erreicht war. Schließlich wurden die Zellen für 7 min bei 3800 x g (Beckman-Rotor JA-14; 4 °C) sedimentiert, in 20 ml oder 50 ml PBS-K/1 mM EDTA aufgenommen, in Fraktionen zu je 10 ml aufgeteilt und erneut zentrifugiert (Megafuge, 6200 x g, 7 min, 4 °C). Die Bakterien-Sedimente wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.5 Reinigung der rekombinanten Proteine

Um die Bakterien aufzuschließen, wurden sie mit der zweieinhalbfachen Menge (w/w) Aluminiumoxid in einem eiskalten Porzellanmörser zu einer homogenen Paste verrieben. Nach der Zugabe von 5 ml eiskaltem Puffer (PBS für GST-Fusionsproteine bzw. His₆-Lysierpuffer für solche mit Hexahistidin-Anteil, s. 2.2.3.5.2) wurde die Suspension in ein 10 ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt und 1 min intensiv gemischt ("Vortex Genie 2", maximale Geschwindigkeit). Dann wurden Aluminiumoxid und Zelltrümmer bei 6200 x g (Megafuge, 15 min, 4 °C) sedimentiert. Aus dem klaren Überstand wurde das gewünschte Protein mit Hilfe einer Affinitätsmatrix isoliert (2.2.3.5.1 und 2.2.3.5.2). Sämtliche Proteinreinigungen wurden unter nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die Reinheit des gewonnenen Proteins wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung untersucht und die Ausbeute durch Vergleichen mit einem BSA-Mengenstandard auf dem SDS-Gel abgeschätzt.

2.2.3.5.1 GST-Fusionsproteine

(Smith und Johnson, 1988)

Glutathion-Elutionspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM Glutathion (reduziert)

Die Methode zur Isolierung dieser Proteine beruht auf der hohen Affinität der Glutathion-S-Transferase zu Glutathion. 85 mg der lyophilisierten Glutathion-Agarose ließ man zunächst über Nacht in 4 ml Wasser bei 4 °C quellen. Von der resultierenden, ca. 25 %igen Suspension wurde typischerweise die Hälfte, also ca. 0,5 ml Agarose, für

die Aufarbeitung eines Äquivalents von 100 ml Bakterienkultur verwendet. Die Agarose wurde zweimal mit je 9 ml eiskaltem PBS gewaschen und dann mit dem Bakterienlysat für 2 h bei 4 °C inkubiert (Taumler). Die Agarose wurde sedimentiert (Megafuge, 700 x g, 2 min, 4 °C) und viermal mit je 9 ml PBS gewaschen. Das gebundene GST-Fusionsprotein wurde viermal mit je 0,5 ml Glutathion-Elutionspuffer eluiert, gegen 0,1 x PBS dialysiert und lyophilisiert. Für Interaktionsstudien (GST-*Pulldown*) bestimmte Proteine wurden nicht eluiert, sondern die Glutathion-Agarose bei 4° als 20 %ige Suspension in PBS mit 0,05 % Natriumazid gelagert.

2.2.3.5.2 Proteine mit Hexahistidin-Tag

His ₆ -Lysierpuffer:	50	mМ	NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0			
	300	mМ	NaCl (autoklaviert)			
	10	mM	Imidazol			
His ₆ -Waschpuffer:	50	тM	NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0			
	300	mМ	NaCl (autoklaviert)			
	20	mM	Imidazol			
His ₆ -Elutionspuffer:	50	mМ	NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0			
	300	mМ	NaCl (autoklaviert)			
	250	mМ	Imidazol			

Hier kommt eine Affinitätsmatrix mit immobilisierter Nitrilotriessigsäure (NTA) zum Einsatz, an der Nickelionen als Chelatkomplex gebunden sind. Die hier beschriebene Vorgehensweise zur Reinigung von His₆-Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen beruht auf den Angaben in der Broschüre "The QIAexpressionist" der Firma Qiagen (fünfte Auflage, 2001).

Üblicherweise wurde 1 ml der Nickel-NTA-Agarose-Suspension (50 %ig) für das Lysat aus 100 ml Bakterienkultur verwendet. Die Agarose wurde dreimal mit 9 ml His₆-Lysierpuffer gewaschen und danach mit dem Bakterienlysat für 1 h bei 4 °C inkubiert (Taumler). Es wurde viermal mit 9 ml His₆-Waschpuffer gewaschen und dreimal mit je 0,5 ml His₆-Elutionspuffer eluiert. Das Protein wurde bei -80 °C gelagert oder dialysiert und lyophilisiert. Einige Thioredoxin-Fusionsproteine blieben nur in Gegenwart von Triton X-100 in Lösung und wurden deshalb vor dem Einfrieren mit 0,5 % Triton versetzt.

2.2.3.6 Gewinnung polyklonaler Antikörper

Die Immunisierung von Kaninchen mit dem jeweiligen GST-Fusionsprotein als Antigen erfolgte durch die Firmen Biogenes (Berlin) für den BKAP-B1- oder Eurogentec (Herstal, Belgien) für den BK6B-1-Antikörper nach deren Standardprotokoll. Die Immunisierungen mit GST-BKAP-B1 fanden 7, 14 und 28 Tage nach der ersten Injektion statt, während im Falle von GST-BK6B-1 die weiteren Injektionen nach 14, 28 und 56 Tagen erfolgten und nach 66 und 87 Tagen das Antiserum gewonnen wurde. Die Aktivität und Spezifität der gelieferten Antiseren wurde im *Western Blot* getestet.

2.2.3.7 Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper

2.2.3.7.1 Entfernen von GST-Antikörpern

Für die Detektion des BK-Kanals in den Eluaten aus einigen GST-*Pulldown*-Experimenten (2.2.4.2.2) wurde ein BK6B1-Antiserum eingesetzt, das von Antikörpern gegen GST weitestmöglich befreit worden war. 60 µl Serum wurden auf 300 µl in 1 x TBS / 0,5 % BSA verdünnt und nacheinander mit 100 µg und 50 µg GST-Protein, gebunden an Glutathion-Agarose, bei 4 °C inkubiert. Für den zweiten Reinigungsschritt wurden 5 µg GST per *Western Blot* auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, die Bande ausgeschnitten, mit *Western*-Blockierlösung blockiert und mit dem Überstand der GST-Agarose über Nacht bei 4 °C inkubiert. Verbliebene Antikörper gegen GST wurden vor der Verwendung des Antiserums außerdem mit 50 µg/ml GST in *Western*-Blockierlösung über Nacht bei 4 °C blockiert.

2.2.3.7.2 Reinigung an immobilisiertem Antigen

PBS-Azid:	PBS 0,01	%	pH 7,4 (autoklaviert) NaN ₃
Blockierlösung:	PBS- 5	Azid	mit: Milchpulver (fettarm)
Waschpuffer-1:	PBS- 1	Azid	mit: BSA
Waschpuffer-2:	PBS- 1 0,5	Azid % %	mit: BSA Triton X-100 (w/v)

Elutionspuffer: 0,2 M Glycin pH 2,5 150 mM NaCl 0,1 % BSA

Das BKAP-B1-Antiserum wurde mit dem Thioredoxin-Fusionsprotein des Antigens gereinigt. Zunächst wurden 100 μ g des Proteins in 0,5 ml PBS-Azid an 4 cm² Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schüll) 2 h bei RT adsorbiert, gewaschen und 2 h bei RT in Blockierlösung inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran getrocknet, in PBS-Azid rehydriert und zweimal mit 500 μ l Elutionspuffer behandelt. Die Membran wurde mit PBS-Azid gewaschen, 2 h bei RT in Blockierlösung inkubiert und erneut gewaschen. 50 μ l Antiserum wurden mit 450 μ l Blockierlösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde mit Waschpuffer-2 und zweimal mit 500 μ l Elutionspuffer, wobei jeweils 1 min kräftig gemischt (Vortex) und die Eluate sofort mit 125 μ l 1 M Tris-HCl pH 8 neutralisiert wurden. Die vereinigten Eluate wurden gegen PBS dialysiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

2.2.4 Untersuchung von Proteininteraktionen

2.2.4.1 Wechselwirkung mit membrangebundenen Proteinen (*Filter Overlay*)

(Wyszynski und Sheng, 1999)

Puffer A:	10	mМ	HEPES pH 7,5
	60	mМ	KCl
	1	mМ	EDTA
	1	mМ	2-Mercaptoethanol
Puffer B:	25	mМ	HEPES pH 7,5
	120	mМ	KCl
	1	mМ	EDTA
	0,2	%	Triton X-100

Mit dieser Methode wurde die Interaktion zwischen gereinigten rekombinanten Proteinen, und zwar jeweils einem GST-Fusionsprotein und einem Protein mit T7-Epitop, getestet.

100 - 400 ng eines Proteins wurde per Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Bei einigen Experimenten wurde das gebundene Protein schrittweise

renaturiert (Li *et al.*, 1992), wobei die Membran in fallenden Konzentrationen von Guanidinium-HCl inkubiert wurde (6 M; 3 M; 1,5 M; 0,75 M; 0,38 M; 0,19 M; 0,1 M; 0 M in Puffer A, jeweils 10 min bei 4 °C). Dann wurde mit Puffer B + 5 % Milchpulver für 1 h bei 4 °C blockiert und mit dem möglichen Interaktionspartner (1 μ g/ml) in Puffer B + 10 mg/ml BSA über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde je 5 min bei RT zweimal mit Puffer B + 5 % Milchpulver und zweimal mit *Western*-Blockierlösung gewaschen. Die Detektion von spezifisch gebundenem Interaktionspartner erfolgte dann nach der üblichen *Western Blot*-Prozedur.

2.2.4.2 Kosedimentation mit GST-Fusionsproteinen (GST-Pulldown)

2.2.4.2.1 Kosedimentation von in *E.coli* exprimierten Proteinen

Pulldown-Puffer:	1	Х	PBS-K
	1	mМ	EDTA
	2	mМ	DTT
	0,1	%	Triton X-100

Glutathion-Agarose mit 5 μ g gebundenem GST-Fusionsprotein wurde zunächst zweimal mit je 1 ml *Pulldown*-Puffer gewaschen. 2,5 μ g des möglichen Interaktionspartners, der entweder einen Thioredoxin-Fusionsanteil oder ein T7-Epitop besaß, wurden in 500 μ l *Pulldown*-Puffer verdünnt und mit der Afinitätsmatrix für 2 h bei 4 °C über Kopf rotiert. Danach wurde fünfmal mit je 1 ml *Pulldown*-Puffer gewaschen. Zur Elution der Proteine wurde die Matrix mit 50 μ l oder 100 μ l Laemmli-Probenpuffer (2x) versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Zur Analyse im *Western Blot* wurden üblicherweise 10 - 20 % des Eluats eingesetzt.

2.2.4.2.2 Kosedimentation aus Lysaten von Säugetierzellen

(Wyszynski und Sheng, 1999)

Lysierpuffer:	1	х	PBS-K
	1	mМ	EDTA
	2	mМ	DTT
	1	%	Triton X-100
	10	µg/ml	Leupeptin
Waschpuffer:	1	х	PBS-K
	1	mМ	EDTA
	2	mМ	DTT
	0,1	%	Triton X-100

Für einen Ansatz wurden transfizierte COS-Zellen von zwei 10 cm-Zellkulturschalen mit 1 ml Lysierpuffer wie unter 2.2.5.3 beschrieben geerntet und sofort verwendet. Bei diesen Experimenten wurde 10 µg matrixgebundenes GST-Fusionsprotein eingesetzt, zweimal mit 1 ml Lysierpuffer gewaschen und mit dem Lysat 2 h oder über Nacht bei 4 °C über Kopf rotiert. Die Agarose wurde einmal mit 1 ml Lysier- und viermal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 40 - 50 µl Laemmli-Probenpuffer (2x) für 15 min bei 55 °C. Für die *Western*-Analyse wurden 20 µl des Eluats über ein 7,5 %iges SDS-Gel aufgetrennt.

2.2.4.3 Kovalente Kopplung an aktivierte Agarose

Für die Interaktionsstudien mit Glutathion, die immobilisiertes Peptid und eine vergleichbare Kontrollmatrix erforderten, wurde das "Sulfolink"-System verwendet. Die Kopplung geschieht hier über eine Sufhydrylgruppe des Peptids, die eine nucleophile Substitutionsreaktion mit der Iodacetylgruppe eingeht:

Agarose-R-CO-CH₂-I + HS-R \rightarrow Agarose-R-CO-CH₂-S-R + HI

Die Kopplung erfolgte bei 25 °C nach den Angaben des Herstellers mit 0,5 ml 8 mM reduziertem Glutathion oder 8 mM L-Cystein an je 0,5 ml Bettvolumen aktivierte Agarose. Die Lagerung erfolgte in 0,05 % NaN₃ bei 4 °C. Glutathion- und der Kontrollmatrix wurden für Interaktionsexperimente wie unter 2.2.4.2.1 beschrieben, aber ohne GST-Fusionsprotein sowie ohne DTT im *Pulldown*-Puffer eingesetzt.

2.2.4.4 Das Zwei-Hybrid-System in Hefe

(Fields und Song, 1989)

2.2.4.4.1 Das verwendete Hefesystem

(Vojtek et al. 1993; Hollenberg et al., 1995)

Die Zwei-Hybrid-Experimente wurden mit *S.cerevisiae* des Stammes L40 durchgeführt, der Auxotrophien für Adenin, Uracil, Tryptophan, Leucin und Histidin aufweist. Die Reportergene, *HIS3* und *lacZ*, stehen unter der Kontrolle von 4 bzw. 8 Kopien des LexA-Operators aus *E.coli*. Um Proteininteraktionen zu testen, wurde die Hefe mit pLexN, der für ein Hybridprotein mit der DNA-Bindungsdomäne LexA aus *E.coli* kodiert, und pVP16 oder pGAD424 kotransformiert. pVP16 fusioniert die zu testende Sequenz mit der Transkriptions-Aktivierungsdomäne VP16 des Herpes Simplex-Virus, während pGAD424 die Aktivierungsdomäne aus dem Transkriptionsfaktor Gal4 der Hefe verwendet.

2.2.4.4.2 Transformation von Hefe

(Hill et al., 1991) Lithiumacetat: pH 7,5 mit Essigsäure, autoklaviert 1 Μ LiAc/TE: 100 mM Lithiumacetat 0.5 TE pH 7,5 (autoklaviert) х LiAc/PEG/TE: 100 mM Lithiumacetat TE pH 7,5 (autoklaviert) 0,5 х % Polyethylenglycol-3350 (v/v) (autoklaviert) 40

Für 20 Transformationen wurden 10 ml YADP-Medium mit einer L40-Kolonie von einer YAPD-Platte angeimpft. (Bei mit einem Plasmid vortransformierter Hefe wurden UT-Medium und -Platten (pLex) bzw. UL-Medium und -Platten (pVP16) verwendet. Nach Inkubation über Nacht bei 30 °C und 320 rpm wurde die Kultur mit Medium so verdünnt, daß in 50 ml Endvolumen eine OD_{600} von 0,4 vorlag. Die Zellen wurden unter Schütteln 4 h bei 30 °C inkubiert, sedimentiert (Megafuge, 4000 x g, 5 min, 20 °C) und mit 40 ml TE (1x) gewaschen. Dann wurde die Hefe in 2 ml frisch angesetztem LiAc/TE resuspendiert und 1 h bei 30 °C und 70 rpm geschüttelt. Pro Transformationsansatz vermischte man auf Eis 100 µg denaturierte Lachssperma-DNA mit je 2 µg Plasmid-DNA und fügte 100 µl der Hefesuspension hinzu. Nach Zugabe von 700 µl frisch angesetztem LiAc/PEG/TE wurde 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 88 µl DMSO erfolgte ein exakt siebenminütiger Hitzschock bei 42 °C im Wasserbad. Die Zellen wurden bei 1300 x g sedimentiert (Tischzentrifuge, RT), einmal mit TE gewaschen, in 1 ml YAPD aufgenommen und in einem belüfteten Röhrchen 3 h bei 30 °C und 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Hefe mit TE gewaschen, in 100 µl TE resuspendiert und auf UTL⁻ und THULL⁻Selektionsnährböden ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte 3 - 5 Tage bei 30 °C. Die UTL⁻-Platte stellt eine Kontrolle für die erfolgreiche Transformation beider Plasmide dar, und Wachstum der Hefe auf THULL⁻ zeigte an, daß die getesteten Proteine im Hefesystem interagieren.

2.2.4.4.3 Präparation von Lachssperma-DNA für die Transformation

0,5 g Lachssperma-DNA wurden in 50 ml TE pH 8,0 über Nacht bei 4 °C gelöst. Die DNA-Lösung wurde unter Eiskühlung viermal je 30 s mit Ultraschall behandelt ("Sonopuls GM 70", ca. 70 % Leistung), sodaß in der gelelektrophoretischen Analyse (2.2.1.1.3) eine durchschnittliche Länge der DNA-Fragmente von ca. 5 kb erkennbar war. Anschließend wurde die DNA-Lösung mit 1 Vol. TE-gesättigtem Phenol und 1/10 Vol. Chloroform extrahiert und zur Phasentrennung 10 min bei 6200 x g zentrifugiert. Danach wurde die wäßrige Phase zweimal mit jeweils 0,5 Vol. Phenol und 0,5 Vol. Chloroform extrahiert und wie oben zentrifugiert. Nach einer abschließenden Extraktion mit 1 Vol. Chloroform wurde die DNA mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 3 Vol. Ethanol gefällt und 10 min bei 6200 x g zentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde mit 75 % Ethanol gewaschen und in TE-Puffer pH 7,5 aufgenommen, sodaß eine Konzentration von 4 mg/ml vorlag. Zur Denaturierung der DNA wurde die Lösung für 20 min in einem kochenden Wasserbad inkubiert und danach sofort in ein Eiswasserbad überführt. Die Lagerung erfolgte in 0,5 ml-Aliquots bei -20 °C.

2.2.4.4.4 β-Galaktosidasetest

(Duttweiler, 1996)

Agaroselösung:	200	mМ	K_2HPO_4
	75	mМ	KH ₂ PO ₄ (pH 7,0)
	1	%	Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt

Die zu testenden Hefekolonien wurden auf der Nährmediumplatte (15 cm) mit Chloroform vollständig bedeckt und 5 min bei RT inkubiert. Das Chloroform wurde entfernt und die Platte 5 min bei RT getrocknet (Abzug). 30 ml Agaroselösung wurden aufgekocht, auf 40 °C äquilibriert, mit 1 ml 30 mg/ml X-Gal versetzt und auf die Platte gegeben. Die Platte wurde bei 30 °C inkubiert und nach 10 min, 30 min, 2 h und 24 h die Intensität der Färbung abgeschätzt.

2.2.5 Experimente mit Säugetierzellinien in Kultur

Für die meisten Experimente wurden COS-7-Zellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) eingesetzt, eine Zellinie, die aus Nierenzellen eines Affen abgeleitet ist (Gluzman, 1981) und die Fähigkeit besitzt, Plasmide mit SV-40-Replikationsursprung zu replizieren.

2.2.5.1 Zellkultur

Standardmedium COS-7:	1	Х	DMEM
	2	mМ	Glutamat
	1	Х	Penicillin/Streptomycin
	10	%	Fötales Rinderserum

Die Zellen wurden als *Monolayer*-Kultur in 75 cm²-Gewebekulturflaschen mit 20 ml Standardmedium in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. Alle für das Umsetzen der Zellen benötigten Lösungen wurden auf 37 °C vorgewärmt. Die konfluent gewachsenen Zellen wurden mit PBS gewaschen und 3 min bei 37 °C in Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco) inkubiert. Die Zellen wurden in 10 ml Standardmedium suspendiert, gezählt und für die Transfektion in Kulturschalen verteilt.

2.2.5.2 Transiente Transfektion

Pro geplanter Transfektion wurden 8 x 10^4 - 1 x 10^5 COS-Zellen mit 2 ml Standardmedium in einer Kulturschale (3,5 cm Durchmesser) für 20 - 24 h inkubiert. 100 µl Opti-MEM wurden 3,5 µl Fugene 6 und 1 µg DNA hinzugefügt und 20 min bei RT inkubiert. Dann wurde die Mischung zu den Zellen gegeben. Für Transfektionen in größeren Kulturschalen wurden alle Mengen nach dem Verhältnis der Oberflächen umgerechnet.

Bei einigen Transfektionen wurde Lipofectamin nach den Angaben de Herstellers verwendet. Für einige Immunfluoreszenz-Experimente kam ferner Lipofectin zum Einsatz, das jedoch wesentlich weniger effizient als Fugene oder Lipofectamin ist. Die Methode der Transfektion hatte ansonsten keinen Einfluß auf die in der *Western*-Analyse oder der Immunfluoreszenz erzielten Ergebnisse.

2.2.5.3 Lysate für Western- und Interaktionsstudien

1	Х	TBS
1	%	Nonidet P-40 (w/v)
0,5	%	Deoxycholat
0,1	%	SDS
1	mM	DTT
1	Tabl./10 ml	"Complete Mini" Proteaseinhibitoren
	1 1 0,5 0,1 1 1	1 x 1 % 0,5 % 0,1 % 1 mM 1 Tabl./10 ml

Die COS-Zellen wurden üblicherweise 2 - 3 Tage nach der Transfektion geerntet. Die Lyse erfolgte mit 300 µl frisch angsetztem, eiskaltem RIPA-Puffer je 6 cm-Kulturschale (oder 1 ml Puffer pro 10 cm-Schale). Nach halbstündiger Inkubation bei 4 °C wurde das Lysat mit Zellschaber und Pipette aus der Kulturschale entfernt und zur weiteren Extraktion der Membranproteine 1 h bei 4 °C über Kopf rotiert. Unlösliche Anteile wurden für 20 min bei 15800 x g (Kühlzentrifuge; 4 °C) sedimentiert und anschließend ggf. für die *Western*-Analyse mit Laemmli-Puffer extrahiert (30 min bei RT). Die Lysate wurden sofort verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-System von Pierce mit BSA-Lösung als Standard bestimmt. Aliquots der zu testenden Lysate wurden mit 1 Vol. TBS versetzt und eine Verdünnungsreihe der BSA-Stammlösung so angesetzt, daß auch in diesen Proben der jeweilige Lysierpuffer in einer 1:1-Verdünnung vorlag. Reagenz A wurde mit 1/50 Vol. Reagenz B versetzt und je 1 ml der Mischung zu 50 µl der Proteinlösung gegeben. Nach dreißigminütiger Inkubation im Wasserbad bei 37 °C ließ man die Proben auf RT abkühlen und bestimmte die Absorption bei 562 nm. Aus der BSA-Eichkurve wurde die Proteinkonzentration der unbekannten Proben berechnet.

2.2.5.5 Immunfluoreszenz

2.2.5.5.1 Beschichten von Deckgläsern

Die Deckgläser wurden zur Reinigung 30 min in Ethanol (p.a.) inkubiert, in eine Glaspetrischale überführt und für 4 h bei 200 °C sterilisiert. Die abgekühlten Deckgläser wurden mit 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin bedeckt, über Nacht bei RT inkubiert und dreimal mit sterilfiltriertem Wasser gewaschen.

2.2.5.5.2 Nachweis der Proteine

Blockierlösung:	1	х	PBS
	10	%	Fötales Rinderserum
	2	%	BSA

24 h nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert und jeweils 4 x 10^4 COS-7 in 2 ml Standardmedium auf ein in einer 3,5 cm-Kulturschale plaziertes, lysinbeschichtetes Deckglas gegeben. Nach 2 Tagen wurden die Deckgläser mit PBS gewaschen und die Zellen mit 4 % PFA in PBS (pH 7,3) für 10 min bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen wurde für 2 min bei RT mit 0,2 % Triton in PBS permeabilisiert. Die Deckgläser wurden viermal mit PBS gewaschen und in einer geschlossenen, feuchten Kammer 30 min bei 37 °C mit je 250 µl Blockierlösung inkubiert. Dann folgte eine einstündige Inkubation mit dem in Blockierlösung verdünnten Erstantikörper (je 200 µl) bei 37 °C. Die Deckgläser wurden viermal mit PBS gewaschen und der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Zweitantikörper in Blockierlösung eingesetzt (Inkubation 30 min bei 37 °C). Nach dreimaligem Waschen wurden 15 µl "ProLong" *Antifade*-Lösung (Molecular Probes) auf das Deckglas gegeben, das anschließend auf einem Objektträger plaziert wurde. Man ließ über Nacht trocknen und versiegelte dann die Ränder des Deckglases mit Nagellack. Alle gezeigten Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Mikroskop und dem Objektiv "Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil DIC" angefertigt.

2.2.6 Biochemische Experimente mit neuronalem Gewebe

2.2.6.1 Membranpräparation und Extraktion von Membranproteinen

(Wyszynski und Sheng, 1999)

Homogenisierungspuffer:	10	mM	Tris-HCl pH 7,4				
	320	mM	Saccharose				
	1	Tabl./10 ml	"Complete Mini" Proteaseinhibitoren				
Suspensionspuffer:	20	mM	Tris-HCl pH 7,4				
	1	Tabl./10 ml	"Complete Mini" Proteaseinhibitoren				
Extraktionspuffer (2x):	2	Х	TBS pH 7,3				
	10	mМ	EDTA				
	2	mM	DTT				
	2	%	SDS				
	1	Tabl./10 ml	"Complete Mini" Proteaseinhibitoren				

Eine adulte, männliche Wistar-Ratte wurde anästhesiert und dekapitiert, das Gehirn präpariert und mit dem Skalpell auf Eis zerkleinert. Das Gewebe wurde mit 3 ml Homogenisierungspuffer in einem Glasgerät mit eng sitzendem Teflonpistill gründlich homogenisiert. Gewebetrümmer und Zellkerne wurden bei 1000 x g sedimentiert (10 min, 4 °C) und einmal mit 1 ml Homogenisierungspuffer gewaschen. Das Sediment wurde für die *Western*-Analyse aufbewahrt und die vereinigten Überstände einer Ultrazentrifugation bei 60000 x g für 1 h unterzogen (Beckman Optima TLX 120, SW 60-Rotor; 4 °C). Der Überstand stellt die lösliche Fraktion dar. Das Sediment wurde mit 8 ml Suspensionspuffer gewaschen und wie oben, jedoch für 40 min zentrifugiert.

Das Sediment, die Membranfraktion, wurde in 2 ml Suspensionspuffer resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Membransuspension wurde mit 1 Volumen Extraktionspuffer (2x) versetzt und 1 h über Kopf rotiert. Dann wurde für 1 h bei 60000 x g zentrifugiert (Beckman-Rotor TLA 120.1; 4 °C). Die Extraktion des o.g. ersten Sediments erfolgte analog für 1,5 h. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt wie unter 2.2.5.4 beschrieben. Die Denaturierung der Proben für die *Western*-Analyse erfolgte für 15 min bei 55 °C.

2.2.6.2 Primärkultur von Hippcampus-Neuronen

(Brewer et al., 1994)

Kulturmedium:	Neurobasal A mit:							
	1	Х	B27					
	2	mМ	L-Glutamin					
	5	ng/ml	bFGF					

Eine trächtige Wistar-Ratte wurde mit CO₂ getötet, die Embryonen (E18) entnommen, dekapitiert und aus den Gehirnen unter dem Mikroskop die Hippcampi präpariert. Die Hippocampi wurden in Hibernate A / B27-Medium gesammelt. Das Gewebe wurde für 15 min bei 37 °C mit Trypsin-EDTA (0,05 % w/v Trypsin und 0,02 % w/v EDTA in PBS, Biochrom) behandelt, zweimal mit Neurobasal / B27-Medium gewaschen und die Suspension vorsichtig mit einer Spritze homogenisiert (18G-Kanüle, 10 x). Nach Zentrifugation bei 1100 rpm (Megafuge, 10 min) wurde das Sediment mit 5 ml Kulturmedium aufgenommen und erneut homogenisiert. Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern (2.2.5.5.1) in Zellkulturschalen mit einer Konzentration von mindestens 2 x 10⁵ Zellen/ml ausgesät und nach 30 min ein Volumen Kulturmedium zugegeben. Am nächsten Tag wurde die Hälfte des Mediums gegen frisches ausgetauscht. Die Zellen wurden für 2 – 3 Tage in Kultur gehalten und anschließend die Detektion für die Immunfluoreszenz durchgeführt wie unter 2.2.5.5.2 beschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung und Sequenzanalyse des BK-assoziierten Proteins, BKAP

3.1.1 Identifizierung von BKAP als potentieller Interaktionspartner von BK

In unserer Arbeitsgruppe wurde das Zwei-Hybrid-System eingesetzt, um mit dem intrazellulären carboxy-terminalen Ende des BK-Kanals der Ratte eine cDNA-Bibliothek aus Rattenhirn (Okamoto und Südhof, 1997) nach potentiellen Interaktionspartnern zu durchsuchen (A. Ruppelt, 1997). Aus der Durchmusterung der Bibliothek mit den 157 C-terminalen Aminosäuren des Kanals (BK6B, Abb. 1A) resultierten 43 überlappende Klone (Abb. 1B). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Klone E3-1 und N11-1 aus pVP16 in pBluescript KS⁺ subkloniert und vollständig sequenziert. Ihre Interaktion mit dem Kanalfragment im Hefesystem wurde bestätigt und mit verschiedenen Kontrollexperimenten untermauert, wie in Kap. 3.2.2 gezeigt. Die längste cDNA, N11-1, kodiert für ein Protein von 359 Aminosäuren und reicht bis zum poly-A. Beim Vergleich der N11-1-Sequenz mit den Sequenzen in der NCBI-Datenbank stellte sich heraus, daß das aus der cDNA abgeleitete Protein in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde. Das Protein wurde BKAP (für <u>BK-assoziiertes P</u>rotein) genannt.

N11-1 enthält eine Kassette von 30 Aminosäuren, die nicht für die Interaktion mit BK6B erforderlich ist, da die Sequenz in einigen der anderen, aus der cDNA-Bibliothek isolierten Klone nicht vorkommt. Die N11-1 entsprechende Variante des Proteins wurde mit BKAP-A und die E3-1-Variante mit BKAP-B bezeichnet. Die Ziffer am Ende des Namens der BKAP-Variante zeigt an, daß es sich um ein Konstrukt und nicht um das vollständige Protein handelt (Abb. 1B). Die Existenz weiterer Spleißvarianten von BKAP wurde mit reverser Transkriptions-PCR (RT-PCR) nachgewiesen (3.1.2).

Beim Durchsuchen der entsprechenden NCBI-Datenbank mit der BKAP-Sequenz finden sich auch zahlreiche EST (*expressed sequencing tags*)-Sequenzen der Maus und einige solche Sequenzen der Ratte. Mit der für BKAP-A1 kodierenden DNA-Sequenz wurden mittels "blastn"-Suche insgesamt 10 ESTs der Ratte identifiziert, von denen



5 ESTs BKAP und 4 dem ähnlichen Protein ssDP (vgl. 3.1.3) zuzuordnen sind (nur ESTs größer als 40 bp berücksichtigt; Stand Oktober 2002).

Abb. 1: Isolierung verschiedener BKAP-cDNAs mit dem Zwei-Hybrid-System in der Hefe.

A) Die Lage des Konstruktes BK6B (Aminosäuren 1049 – 1205) im C-Terminus des BK-Kanals. Die hydrophoben Domänen S7 bis S10 sind intrazellulär. BK6B wurde als "Köder" bei der Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek aus Rattenhirn eingesetzt.

B) zeigt eine Auswahl der 43 überlappenden Klone, die als Interaktionspartner von BK6B aus der cDNA-Bibliothek isoliert wurden. BKAP-A1 kodiert für ein Protein mit 359 Aminosäuren und umfaßt die vollständige kodierende Sequenz von BKAP-A bis auf das Start-Methionin und Tyrosin, wie durch Vergleiche mit Maus-ESTs aus der NCBI-Datenbank abgeleitet wurde.

Anhand der BKAP-ESTs, die sich weiter in den 5'-Bereich erstrecken als die isolierten cDNAs aus der Bibliothek (Abb. 1B), war es möglich, die vermutlich vollständige kodierende Sequenz von BKAP herzuleiten. Die EST-Sequenzen bestätigen nicht nur die N-terminale Aminosäuresequenz Met-Tyr, die auch im offenen Leserahmen des Klons J16-12 aus dem Hefeexperiment vorkommt. Sie lassen auch den Schluß zu, daß es sich um das Start-Methionin handelt, da ein Stopkodon auftritt, wenn der Leserahmen von diesem Methionin aus stromaufwärts fortgesetzt wird. Das Stopkodon wurde in Abb. 1B mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet.

AIG	TAC	GGC	AAA	GGC	AAG	AG I	AAC	AGC	AGC	GCC	GIC	CCG	ICC	GAC	AGC	CAG	GCC	64
M	Y	G	K	G	K	S	N	S	S	A	V	P	S	D	S	Q	A	18
CGG	GAG	AAG	TTA	GCG	CTC	TAC	GTG	TAT	GAA	TAT	CTG	CTC	CAT	GTA	GGA	GCT	CAG	108
R	E	K	L	A	L	Y	V	Y	E	Y	L	L	H	V	G	A	Q	36
AAA K	TCG S	GCC A	CAG Q	ACA T	TTT F	TTA L	TCA S	GAG E	$_{\rm I}^{\rm ATA}$	AGA R	TGG ₩	GAA E	AAA K	AAC N	$_{\rm I}^{\rm ATC}$	ACA T	ttg L	162 54
GGG	GAG	CCG	CCA	GGA	TTC	TTA	CAT	TCT	TGG	tgg	TGT	GTG	TTT	TGG	GAT	CTC	TAC	216
G	E	P	P	G	F	L	H	S	₩	₩	C	V	F	₩	D	L	Y	72
TGT	GCA	GCT	CCA	GAG	AGA	CGG	GAA	ACC	TGT	GAA	CAC	TCG	AGC	GAA	GCA	AAA	GCC	270
C	A	A	P	E	R	R	E	T	C	E	H	S	S	E	A	K	A	90
TTC	CAT	GAT	TAT	AGT	GCT	GCA	GCA	GCT	CCC	AGC	CCC	GTG	CTA	GGA	AAC	ATG	CCC	324
F	H	D	Y	S	A	A	A	A	P	S	P	V	L	G	N	M	P	108
CCA	GGA	GAT	GGC	ATG	CCC	GTA	GGC	<u>ссс</u>	<u>gtg</u>	CCA	CCA	GGG	TTC	TTT	CAG	CCT	TTT	378
P	G	D	G	M	P	V	G	Р		P	P	G	F	F	Q	P	F	126
ATG	TCA	сст	CGG	TAC	CCT	GGA	GGC	CCA	AGG	<u>ссс</u>	CCG	ttg	AGA	$_{\rm I}^{\rm ATA}$	ССТ	AAT	CAG	432
M	S	Р	R	Y	P	G	G	P	R	Р	P	L	R		Р	N	Q	144
GCA	CTT	GGA	GG⊤	GTC	CCA	GGA	AGT	CAG	CCA	TTA	CTC	CCC	AGT	GGA	ATG	GAC	CCA	486
A	L	G	G	V	P	G	S	Q	P	L	L	P	S	G	M	D	P	162
ACA	CGA	CAA	CAA	GGA	CAT	CCA	AAT	ATG	GGC	GGA	CCG	ATG	CAG	AGA	ATG	ACT	CCC	540
T	R	Q	Q	G	H	P	N	M	G	G	P	M	Q	R	M	T	P	180
CCA	AGA	GGA	ATG	GTG	CCC	TTA	GGA	CCA	CAG	AAC	TAT	GGA	GGT	GCA	ATG	AGA	CCC	594
P	R	G	M	V	P	L	G	P	Q	N	Y	G	G	A	M	R	P	198
CCA	CTG	AAT	GCT	TTA	GGT	GGC	CCC	GGA	ATG	CCT	GGA	ATG	AAC	ATG	GGT	CCA	GGT	648
P	L	N	A	L	G	G	P	G	M	P	G	M	N	M	G	P	G	216
GGT	GGT	AGA	CCG	TGG	CCA	AAC	CCA	ACA	AAT	GCC	AAT	TCA	ATA	CCC	TAC	TCC	TCG	702
G	G	R	P	₩	P	N	P	T	N	A	N	S	I	P	Y	S	S	234
GCG	TCT	CCT	GGG	AAC	TAC	GTA	GGT	CCT	CCA	GGA	GGT	GGA	GGA	CCA	CCA	GGA	ACA	756
A	S	P	G	N	Y	V	G	P	P	G	G	G	G	P	P	G	T	252
CCC	ATC	ATG	CCT	AGT	CCA	GCA	GAT	TCA	ACC	AAT	TCG	GGA	GAC	AAC	ATG	TAT	ACT	810
P	I	M	P	S	P	A	D	S	T	N	S	G	D	N	M	Y	T	270
TTA	ATG	AAT	GCA	GTA	CCT	CCT	GGG	CCT	AAC	AGA	CCT	AAT	TTT	CCA	ATG	GGC	CCT	864
L	M	N	A	V	P	P	G	P	N	R	P	N	F	P	M	G	P	288
GGA	TCA	GAT	GGT	CCC	ATG	GGT	GGA	TTA	GGA	GGA	ATG	GAG	TCC	CAC	CAC	ATG	AAC	918
G	S	D	G	P	M	G	G	L	G	G	M	E	S	H	H	M	N	306
GGC	TCT	TTA	GGC	TCA	GGA	GAC	ATG	GAC	AGT	$_{\rm I}^{\rm ATT}$	TCC	AAG	AAT	TCT	CCC	AAT	AAT	972
G	S	L	G	S	G	D	M	D	S		S	K	N	S	P	N	N	324
ATG	AGC	ttg	AGT	AAC	CAG	CCG	GGC	ACT	CCA	AGG	GAT	GAT	GGC	GAA	ATG	GGG	GGC	1026
M	S	L	S	N	Q	P	G	T	P	R	D	D	G	E	M	G	G	342
AAT	TTC	CTA	AAT	CCC	TTT	CAG	AGT	GAA	AGT	TAC	TCG	CCC	AGC	ATG	ACC	ATG	AGT	1080
N	F	L	N	P	F	Q	S	E	S	Y	S	P	S	M	T	M	S	360
GTG V	TGA	tcc	atta	coge	gtoco	cctco	atgad	aaaco	cate	gtgag	gtca	geced	atcad	caaa	actad	ctac	ggaa	1149 361
gaa	aacto	acte	atog	tgta	cagti	taga		ggaat	toto	agaco	aacco	agaco		tttt	agtto	cotgo	ctot	1220

Abb. 2: Nukleotid- und Proteinsequenz von BKAP-A.

Die 3'-UTR ist durch fortlaufende Kleinbuchstaben kenntlich gemacht, während der translatierte Bereich in Großbuchstaben und Basentripletts dargestellt ist. Die alternative Kassette von 30 Aminosäuren ist mit einem schwarzen Balken markiert. Die eingerahmten prolinreichen Abschnitte mit "PXXP"-Sequenzen sind typische Protein-Protein-Interaktionsmotive, die in Liganden von SH3-Domänen vorkommen. Grau unterlegt: das putative Polyadenylierungssignal (Minvielle-Sebastia und Keller, 1999).

Proteinkinase	Konsensusmotiv	Mögliche Phosphorylierungsstellen
РКА	R-(R/K)-X-(S/T)	⁷⁸ RRET
PKG	$(R/K)_{2-3}-X-(S/T)$	⁷⁸ RRET
РКС	(S/T)-X-(R/K)	¹²⁸ SPR; ³³³ TPR
p34/cdc2	(S/T)-P-X-(R/K)	¹⁷⁹ TPPR
CK II	$(S/T)-X_2-(D/E)$	⁵³ TLGE; ¹⁵⁸ SGMD; ²⁵⁷ SPAD; ³³³ TPRD

Tab. 1: Mögliche Phosphorylierungsstellen in BKAP-A.

Die Aminosäuresequenz von BKAP-A wurde mittels Motivsuche in der "Prosite"-Datenbak und manuell nach potentiellen Phosphorylierungsstellen von Proteinkinasen durchsucht. Konsensusmotive für PKA, PKG und p34/cdc2: Kennelly und Krebs (1991). Konsensusmotive für PKC und CK II (Casein-Kinase II): "Prosite"-Datenbank.

Abb. 2 zeigt die Nukleotid- und Proteinsequenz von BKAP-A. Sie ist bis auf die hinzugefügten N-terminalen Aminosäuren Met-Tyr mit der N11-1-cDNA aus der Bibliothek identisch. Das Protein hat eine berechnete relative Molmasse von 37,8 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 6,45.

Die Proteinsequenz wurde über eine Motivsuche in der Datenbank "Prosite" (Falquet *et al.*, 2002) und manuell mit dem Programm "EditSeq" (DNASTAR) auf bekannte Domänen oder Motive hin untersucht. Die so ermittelten möglichen Phosphorylierungsstellen in BKAP-A sind Tab. 1 zu entnehmen.

Das Protein enthält Abschnitte mit hohen Anteilen von Glycin und Prolin: 23 % Glycin im Bereich von Aminosäure 147 bis 312 und 25 % Prolin im Bereich von Aminosäure 100 bis 293. Prolinreiche Sequenzen, die das Konsensusmotiv "PXXP" in meist zwei bis drei Wiederholungen enthalten, fungieren als Bindungspartner für SH3 ("Src <u>homology</u>")-Domänen, die typische Module für die Assoziation von Proteinen darstellen (Pawson und Scott, 1997; Dalgarno *et al.*, 1997). In der BKAP-A-Sequenz kommen drei solcher prolinreichen Interaktionsmotive vor (Abb. 2).

Das Analyseprogramm PSORT II (Nakai und Kanehisa, 1992), das diverse Algorithmen zur Bestimmung der subzellulären Lokalisierung eines Proteins enthält, sagt eine Kernlokalisierung von BKAP-A voraus. Die Sequenzanalyse mit der *k-nearest neighbour* (k-NN)-Methode führt zu der Voraussage, daß BKAP-A mit 52 % Wahrscheinlichkeit im Zellkern und mit 26 % Wahrscheinlichkeit im Zytoplasma vorkommt. Der k-NN-Algorithmus von PSORT ist in der Lage, die Kernlokalisation von 84 % der Chromatinassoziierten Proteine korrekt vorherzusagen, ist jedoch bei Proteinen, die in der Peripherie des Kerns lokalisiert sind, weniger zuverlässig (40 %; Bickmore und Sutherland, 2002).

3.1.2 BKAP kommt in mehreren Spleißvarianten im Gehirn der Ratte vor

Bereits bei den BKAP-Klonen aus der cDNA-Bibliothek wurde ein alternatives Exon gefunden, das auch bei einem Teil der ESTs aus der Maus vorkommt. Außerdem war bei einigen Klonen (z.B. E3-1) eine einzelne Aminosäure (Q) in der Nähe des C-Terminus insertiert. Um zu untersuchen, welche Spleißvarianten von BKAP im adulten Gehirn vorkommen, wurden mit den *Primern* 1433 und 1434 (s. Anhang) eine PCR auf cDNA aus dem Gehirn einer adulten Ratte durchgeführt (cDNA freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Gymnopoulos). Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Neben der erwarteten Bande bei ca. 1,5 kb trat noch eine schwächere bei ca. 1,4 kb auf (ohne Abbildung). Die Banden wurden separat ausgeschnitten, die DNA in den Vektor pGEM-T kloniert und sequenziert. Die 1,5 kb-Bande entsprach BKAP, während die andere Bande auf die Amplifikation irrelevanter Sequenzen zurückzuführen war.



Abb. 3: Spleißvarianten von BKAP im Rattenhirn.

Die Spleißvarianten wurden mittels PCR auf cDNA aus dem Gehirn einer adulten Ratte identifiziert. Neben dem bereits mit dem Hefesystem isolierten BKAP-A wurden fünf weitere Kombinationen gefunden, darunter eine Variante mit allen bislang bekannten alternativen Kassetten (mit "BKAP" bezeichnet). Das mit einem Stern markierte BKAP-B aus dem Hefesystem ist zum Vergleich gezeigt. Unter den amplifizierten BKAP-Sequenzen befanden sich neben der bereits bekannten BKAP-A/N11-1-Variante fünf weitere Kombinationen von insgesamt drei alternativen Exons sowie dem einzelnen Glutamin, dessen Position innerhalb des dritten Exons liegt (Abb. 3). Die gefundene Spleißvariante mit allen Insertionen umfaßt einen offenen Leserahmen von 371 Aminosäuren und wurde mit BKAP bezeichnet, während Großbuchstaben von A bis F die kürzeren Varianten kenntlich machen.

3.1.3 BKAP ist zu einem Einzelstrang-DNA bindenden Protein homolog

Bei der Datenbanksuche mit der BKAP-Sequenz wurde ein Protein der Ratte identifiziert, dessen Aminosäuresequenz mit BKAP zu 81 % identisch ist (Abb. 4). Dieses Protein wurde bereits aus dem Hühnerembryo (Bayarsaihan *et al.*, 1998) und der Ratte (Raval-Fernandes *et al.*, 1999) kloniert und ssDP genannt (<u>sequence-specific single-stranded-DNA-binding protein</u>). Allerdings liegen zur Funktion des HühnerssDP nur wenige Informationen vor und die Funktion des Proteins aus der Ratte wurde bislang nicht untersucht.



Abb. 4: Ähnlichkeit von BKAP zu einem "Einzelstrang-DNA bindenden Protein".

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt die Ähnlichkeit von BKAP zu ssDP der Ratte (GenBank Nr. AF121893; Raval-Fernandes *et al.*, 1999). Abweichende Aminosäuren wurden schwarz unterlegt. Die alternativen Exons in der BKAP-Sequenz sind numeriert und mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet. ssDP und BKAP sind zu 81 % identisch.

3.3 Untersuchungen zur Expression von BKAP in Ratten

3.3.1 Northern-Analyse zeigt eine weite Verbreitung des BKAP-Transkriptes in Geweben der Ratte

Zur Untersuchung der gewebespezifischen Verteilung sowie zur Ermittlung der Transkriptlänge von BKAP wurde die *Northern Blot*-Analyse einer Nylonmembran durchgeführt, auf die von Seiten des Herstellers (Clontech) polyA⁺-RNA aus verschiedenen Geweben der Ratte transferiert worden war.

Als Matritze für die BKAP-spezifische Sonde diente ein 1,3 kb-Fragment, das mit den Restriktionsendonukleasen *Sal I* und *Nsi I* aus pVP16-BKAP-A1 geschnitten worden war und die vollständige kodierende Sequenz und einen Teil der 3'-UTR umfaßt. Die Synthese der radioaktiv markierten Sonde und die Hybridisierung der Membran erfolgten wie im Methodenteil beschrieben (2.2.2.3).

Wie aus dem Autoradiogramm des *Northern Blots* (Abb. 7) hervorgeht, wird BKAP in allen untersuchten Gewebetypen exprimiert. Dabei ist eine besonders starke Transkription in Testis und im Gehirn und eine sehr schwache in Milz und Leber zu beobachten. Die Länge des Transkripts beträgt ca. 1,8 kb. In Testis wird eine breite Bande detektiert, die sich von ca. 1,8 - 1,5 kb ersteckt.

Die Auflösung des RNA-Gels reichte nicht aus, um die verschiedenen Spleißvarianten von BKAP aufzutrennen, die im Gehirn der Ratte vorkommen (3.1.2). Lediglich eine Spleißvariante ohne alle bekannten alternativen Exone, die zusammen einen Unterschied von ca. 260 bp ausmachen, würde eine erkennbare Verschiebung der Bande zu niedrigerem Molekulargewicht bewirken; eine solche Spleißvariante konnte in der RT-PCR aus neuronaler RNA jedoch nicht identifiziert werden. Möglicherweise werden solche kurzen Transkripte bevorzugt in Testis synthetisiert.

Wie bereits dargelegt, hat BKAP Ähnlichkeit mit dem bereits beschriebenen Protein ssDP (Abb. 4). Im kodierenden Bereich der cDNA weicht die ssDP-Sequenz zu 25,5 % von der BKAP-A1-Sequenz ab, im 3'-untranslatierten Bereich (verglichen vom Stop-Kodon bis zur *Nsi*-Schnittstelle der Sonde) zu mehr als 60 %. Aufgrund der stringenten Waschbedingungen (bei bis zu 65 °C in 0,1 x SET) war die *Northern*-Analyse für BKAP-Transkripte spezifisch (2.2.2.3.2).



Abb. 7: Analyse der BKAP-Transkription mittels Northern Blot.

Auf die Nylonmembran sind je 2 μ g polyA⁺ RNA aus Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Testis der adulten Ratte transferiert worden. Die Membran wurde mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde hybridisiert, die die vollständige kodierende Sequenz und einen Teil der 3'-UTR von BKAP-A1 umfaßt (bp 1 - 1335). Das BKAP-Transkript wird in allen Geweben detektiert, am stärksten in Gehirn und Testis und nur sehr schwach in Milz und Leber. Die RNA-Längenstandards sind links neben der Abbildung in kb angegeben. Die Länge des Transkripts beträgt ca. 1,8 kb.

3.3.2 BKAP und BK werden in Neuronen des peripheren

Nervensystems koexprimiert

Der BK-Kanal wird auch in Neuronen des peripheren Nervensystems exprimiert, z.B. in den oberen Zervikalganglien (*superior cervical ganglion*, SCG), wie elektrophysiologische Studien an SCG-Neuronen der Ratte gezeigt haben (Smart *et al.*, 1987; Davies *et al.*, 1996). Um festzustellen, ob BKAP auch in diesen Neuronen vorkommt, wurde RNA aus den oberen Zervikalganglien der adulten Ratte isoliert (2.2.2.1) und der erste Strang der cDNA synthetisiert (2.2.2.2). Ein zweiter, bis auf das Fehlen der reversen Transkriptase identischer Ansatz diente als eine Kontrolle für die Spezifität der Amplifizierung in der anschließenden PCR. Für die PCR wurde wieder das Oligonukleotidpaar 1433/1434 (s. Anhang) verwendet, das schon bei der RT-PCR mit RNA aus dem Gehirn eingesetzt worden war (3.1.2). Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt und sichtbar gemacht (Abb. 8A, linkes Gel). Man beobachtet eine Bande der erwarteten Größe (ca. 1,5 kb, schwarze Pfeilspitze), die nur aus dem revers transkribierten Ansatz amplifiziert wird. Wie bei dem analogen Experiment mit neuronaler RNA aus dem Gehirn, trat zusätzlich eine schwächere Bande bei ca. 1,4 kb auf (graue Pfeilspitze). Hierbei handelt es sich um ein unspezifisches PCR-Produkt (vgl. 3.1.2).

Ein zweites Experiment sollte zeigen, daß in der RT-PCR tatsächlich BKAP-cDNA amplifiziert worden war. Dazu wurde eine *nested* PCR mit den innenliegenden BKAP-*Primern* 1439 und 1567 und nur 20 Zyklen durchgeführt. Das Auftreten der erwarteten Bande bei 510 bp (Abb. 8A, rechtes Gel) bestätigt, daß BKAP in SCG-Neuronen exprimiert wird.

Mit der gleichen experimentellen Strategie wie für BKAP wurde auch die Existenz von BK-Transkripten in diesen Neuronen nachgewiesen (*Primer*: 402 und 403). Zwei spezifische Banden bei ca. 1,5 und 1,3 kb sind zu beobachten (Abb. 8B; das rechte Bild zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus einem anderen Gel als in Abb. 8A). Das Bandenmuster ist für BK typisch, da es auch in der RT-PCR mit RNA aus anderen Geweben auftritt, und ist auf Spleißvarianten des BK-Transkriptes zurückzuführen (S. Hülsemann, 1998; M. Stocker, persönliche Mitteilung).



Abb. 8: Koexpression von BKAP und BK in SCG-Neuronen.

Die Transkripte von BKAP und BK wurden mittels RT-PCR auf RNA aus oberen Zervikalganglien (SCG) der adulten Ratte nachgewiesen. "+": Ansatz für die reverse Transkription mit Enzym. " – ": identischer Ansatz, jedoch als Kontrolle ohne Enzym.

A) Nachweis der BKAP-Expression in SCG-Neuronen. Die PCR mit der Erststrang-cDNA als Matritze wurde mit den BKAP-spezifischen *Primern* wie unter 3.1.2 durchgeführt. Die schwarze Pfeilspitze markiert das für BKAP erwartete PCR-Produkt (ca. 1,5 kb) und die graue Pfeilspitze ein unspezifisches PCR-Produkt (ca. 1,4 kb). Das rechte Gel zeigt das Ergebnis der *nested* PCR. Das erwartete BKAP-Fragment hat eine Länge von 510 bp.

B) Nachweis der BK-Expression in SCG-Neuronen. Mit BK-spezifischen Oligonukleotiden werden aus der Erststrang-cDNA (wie in A) zwei Banden amplifiziert, die auch aus anderen BK-exprimierenden Geweben erhalten wurden.

3.3.3 Die Expressionsmuster von BKAP und BK im Gehirn der Ratte stimmen weitgehend überein

Die RT-PCR- und Northern-Experimente zeigen, daß BKAP gemeinsam mit BK im Gehirn der Ratte exprimiert wird. Die in situ-Hybridisierung erlaubt es, die Expressionsmuster beider Partner im Gehirn zu analysieren und sollte Aufschluß darüber geben, ob BKAP und BK in Neuronen des zentralen Nervensytems koexprimiert werden. Diese Experimente wurden von M. Gymnopoulos mit radioaktiv markierten Oligonukleotidsonden durchgeführt (Wisden und Morris, 1994; Stocker und Pedarzani, 2000). Um die BKAP- und BK-mRNA zu detektieren, wurden 45 Basenpaare lange, komplementäre Oligonukleotide (antisense) verwendet (BKAP: Nr. 1842, 1844 und 1845; BK: Nr. 233, s. Anhang). Oligonukleotid 1842 erstreckt sich von Stop-Kodon in die 3'-UTR der BKAP-A1-cDNA; im komplementären Bereich sind die BKAP- und die ssDP-cDNA-Sequenz zu 59 % verschieden (Oligonukleotid 1844: 31 %, 1845: 24 % Abweichung der ssDP-Sequenz von BKAP). Daher war nahezu ausgeschlossen, daß die Sonden unter den stringenten Waschbedingungen (45 min in 1 x SSC bei 57 °C) mit ssDP-mRNA kreuzreagieren. Mit allen drei Sonden wurden identische Ergebnisse erzielt. Die Hybridisierung von benachbarten Gewebeschnitten mit einem sense-Oligonukleotid (BKAP: Nr. 1843; BK: Nr. 234) ließ den allgemeinen, unspezifischen Hintergrund erkennen (nicht gezeigt). Als weiteres Kontrollexperiment wurde unmarkiertes antisense-Oligonukleotid im 500-fachen Überschuß zum Hybridisierungsansatz gegeben, um die Spezifität der Sonden zu überprüfen (Abb. 9, "Kontrolle").

In Abb. 9, die einen Überblick über die Expression von BKAP und BK im Gehirn der adulten Ratte (P60) anhand von sagittalen Gewebeschnitten zeigt, ist die Überlappung der Expressionsmuster von BKAP und BK zu erkennen. Hybridisierungssignale für beide Transkripte findet man z.B. in Cortex, Hippocampus, Caudate putamen und olfaktorischem Bulbus. Im nucleus reticularis des Thalamus sind beide Transkripte ebenfalls vorhanden, während BKAP im übrigen Thalamus nur sehr schwach oder gar nicht exprimiert wird. In der Habenula (in der gezeigten Schnittebene nicht sichtbar), wo BK stark exprimiert ist, wird ebenfalls ein überdurchschnittlich starkes BKAP-Signal detektiert.



Abb. 9: Autoradiogramme der in situ-Hybridisierungsexperimente mit BKAP und BK.

Sagittale Gehirnschnitte (P60) wurden mit radioaktiv markierten Oligonukleotidsonden hybridisiert. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Oligonukleotide. Kontrolle: Kompetition mit 500-fachem Überschuß von unmarkiertem Oligonukleotid. Abkürzungen: Cb Cerebellum; CPu Caudate putamen; Cx Cortex; Hi Hippocampus; Mo5 nucleus motorius nervi trigemini; OB olfaktorischer Bulbus; Pn nucleus pontinus; Rt nucleus reticularis; Th Thalamus; Tu olfaktorisches Tuberkel; 7 nucleus nervi facialis. Die Skalierung entspricht 0,5 cm.

Die Dunkelfeldaufnahme des Hippocampus (Abb. 10) zeigt, daß das Hybridisierungssignal von BKAP besonders in den Pyramidenzellen, im Gyrus dentatus sowie in einigen Interneuronen vorkommt. In der Dunkelfeldaufnahme des Cerebellum fällt das BKAP-Signal in den Purkinjezellen auf, das in der Übersicht (Abb. 9) aufgrund der starken Expression von BKAP in der Körnerzellschicht nicht erkennbar ist. Im Cerebellum weisen BKAP und BK jeweils charakteristische Expressionsmuster auf: Während in den Purkinjezellen beide Partner exprimiert werden, kommt in der Körnerzellschicht nur BKAP und in der molekularen Zellschicht nur BK vor.

Die *in situ*-Hybridisierung zeigt, daß BKAP in den meisten Regionen des Gehirns gemeinsam mit BK exprimiert wird, und bestätigt die Koexpression von BKAP und BK auf der zellulären Ebene. Die Expressionsmuster sind zwar sehr ähnlich, aber nicht vollkommen identisch.



Abb. 10: Expressionsmuster von BKAP in Hippocampus (Hi) und Cerebellum (Cb).
Dunkelfeldaufnahmen der mit BKAP-spezifischen Sonden hybridisierten Gewebeschnitte.
Abkürzungen: CA1 CA1-Pyramidenzellschicht, CA2 CA2-Pyramidenzellschicht, CA3 CA3-Pyramidenzellschicht, DG Gyrus dentatus; Gr Körnerzellschicht, ML molekulare Zellschicht, PC Purkinje-Zellschicht. Skalierung entspricht 0,5 mm.

3.4 Biochemische Studien zur Interaktion von BKAP und BK mit rekombinanten Proteinen

Falsch positive Interaktionen sind ein generelles Problem von Bibliotheksdurchmusterungen mit dem Zwei-Hybrid-System. Da sich manche falsch positive Kandidaten durch Kontrollexperimente im Hefesystem nicht ausschließen lassen, ist es unerläßlich, die gefundene Interaktion mit einem unabhängigen experimentellen Ansatz zu bestätigen (z.B. Wyszynski und Sheng, 1999). Der nächste Schritt bestand daher darin zu testen, ob BK und BKAP als *E.coli*-exprimierte Proteine in der Lage sind, *in vitro* miteinander zu interagieren. Zu diesem Zweck wurden die *Filter Overlay*-Methode und die GST-Kosedimentation in unserer Arbeitsgruppe etabliert, wobei N-terminale Konstrukte des K_v1.5 als Positivkontrolle dienten. Im N-Terminus der α -Untereinheiten der K_v-Kanäle befindet sich eine Assemblierungssdomäne, und N-terminale Fragmente dieser Proteine können miteinander interagieren (Li *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1995).

3.4.1 Versuch des Nachweises der Interaktion zwischen BKAP und BK mit Filter Overlay-Experimenten

Beim *Filter Overlay*-Verfahren (2.2.4.1) wird ein Protein per *Western Blot* auf eine Membran (*"Filter"*) transferiert, mit einer Lösung des potentiellen Interaktionspartners inkubiert und der gebundene Interaktionspartner mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. BKAP-B1 wurde als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase exprimiert und BK6B mit einem T7-Epitop fusioniert (2.2.3.4). Abb. 11 zeigt beispielhaft das Ergebnis eines solchen Experiments, bei dem das membrangebundene Protein nach einer Prozedur von Li *et al.* (1992) renaturiert worden war. Während der N-Terminus des K_v1.5 die erwartete Interaktion zeigt (Abb. 11A), war keine Bindung zwischen BKAP und dem BK-Fragment detektierbar (Abb. 11B). Das gleiche Ergebnis wurde erzielt, wenn auf die Renaturierung verzichtet wurde, oder wenn sich die GST-Fusionsproteine auf der Membran und die T7-Fusionsproteine in Lösung befanden (ohne Abbildung).



Abb. 11: Versuch des Nachweises der BKAP-BK-Interaktion im Filter Overlay-Experiment.

A,B) Die mit dem T7-Epitop markierten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (200 ng T7-NK_v1.5 bzw. 400 ng T7-BK6B) und mit 1 μ g/ml des zu testenden GST-Fusionsproteins über Nacht inkubiert. In der Positivkontrolle **A** detektiert der GST-Antikörper spezifisch gebundenes GST-NK_v1.5 beim apparenten Molekulargewicht von T7-NK_v1.5. Das analoge Experiment **B** mit BK6B und BKAP-B1 ist negativ.

C) Western unter Standardbedingungen mit 10 ng T7-BK6B.

3.4.2 GST-Kosedimentation bestätigt die Interaktion von BKAP mit dem C-Terminus des BK-Kanals

Da es mit der *Filter Overlay*-Methode nicht gelungen war, eine Interaktion zwischen BKAP und BK nachzuweisen, wurden die Proteine als nächstes im GST-Kosedimentationsexperiment (*"Pulldown"*) untersucht (2.2.4.2.1). Mit diesem experimentellen Ansatz war, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Zwei-Hybrid-Experimente, eine spezifische Interaktion von BKAP-A1 und BKAP-B1 mit dem "Köder"-Konstrukt BK6B zu beobachten (Abb. 12B). In den folgenden Experimenten kam nur BKAP-B1 zum Einsatz, das sich besser in den Bakterien überexprimieren ließ. BKAP-B1 wurde ebenfalls zusammen mit dem langen C-terminalen BK-Fragment BK11A (Abb. 12A; Aminosäuren 725 - 1205) getestet, das die 157 Aminosäuren des BK6B mit einschließt.



Abb. 12: Spezifische Kosedimentation von BKAP-A1 und -B1 mit immobilisierten BK-Fragmenten. 5 μg der immobilisierten GST-Fusionsproteine wurden mit 2,5 μg T7-markiertem BKAP-A1 oder BKAP-B1 inkubiert und die gebundenen Proteine im *Western Blot* analysiert. Die erneute Detektion der Membran mit einem GST-Antikörper läßt die relativen Mengen der eingesetzten GST-Proteine erkennen. A) Schema der getesteten Konstrukte im C-Terminus des BK-Kanals.

B) Sowohl BKAP-A1 als auch BKAP-B1 binden an GST-BK6B, aber nicht an GST allein.

C) BKAP-B1 interagiert mit dem langen C-terminalen Konstrukt BK11A. Die Negativkontrollen GST, GST-BK316 und GST-NK_v1.5 demonstrieren die Spezifität der Interaktion von BKAP mit dem C-Terminus des BK.

Die Bindung von BKAP-B1 an GST-BK11A ist deutlich detektierbar und spezifisch, jedoch reproduzierbar schwächer als an GST-BK6B (Abb. 12C). Drei unabhängige Experimente bestätigten diese Beobachtung. Verglichen wurden jeweils parallel prozessierte Ansätze, wobei der Nachweis des gebundenen BKAP-B1 nebeneinander auf der gleichen Membran stattfand. Daher erlaubt die *Western*-Analyse eine grobe Schätzung der Menge des sedimentierten Interaktionspartners anhand der Intensität der Banden: Das BKAP-B1-Signal nach BK11A-*Pulldown* lag in der Größenordnung von einem bis zwei Fünfteln des Signals nach BK6B-*Pulldown*. Die Ursache hierfür ist unbekannt. Die Kontrollexperimente nicht nur mit GST allein, sondern auch mit einem anderen intrazellulären Abschnitt des BK-Kanals (GST-BK316, Abb. 12A) und mit GST-NK_v1.5, demonstrieren, daß die Interaktion von BKAP spezifisch mit dem C-Terminus des BK erfolgt (Abb. 12C).



Detektion: anti-T7

Abb. 13: Alterung des GST-BK6B führt zum Verlust der Interaktion mit BKAP.

Überstand (Ü) bzw. Eluat (PD) von GST-*Pulldown*-Experimenten mit jeweils gleichen Mengen von Proteinen unterschiedlichen Alters. Die Duchführung war identisch mit dem in Abb. 12 gezeigten Experiment. GST-BK6B (n): frisch präparierte Affinitätsmatrix, 3 Tage bei 4 °C gelagert; Lagerung der induzierten Bakterien 3 Tage bei -80 °C. GST-BK6B (a): gealterte Affinitätsmatrix, 20 Tage bei 4 °C gelagert; Lagerung der induzierten Bakterien 2 Monate bei -80 °C. Ü1/PD1: frisch isoliertes BKAP-B1-Protein verwendet (3 Tage/-80 °C). Ü2/PD2: BKAP-B1-Protein 11 Wochen bei -80 °C gelagert.

Die Interaktion zwischen BKAP und dem BK-Fragment kann durch die Alterung der Proteine, insbesondere von GST-BK6B, stark beeinträchtigt werden, wie aus Abb. 13 hervorgeht. In diesem GST-Kosedimentationsexperiment ist der kombinierte Effekt der Alterung der Bakterien vor der Isolierung des GST-BK6B (2 Monate Lagerung bei -80 °C) und der Alterung des agarosegebundenen Proteins (20 Tage bei 4 °C) zu sehen. Mit dieser Affinitätsmatrix "GST-BK6B (a)" war, abhängig auch vom Alter des

verwendeten BKAP-B1-Proteins, wenig oder keine Interaktion nachweisbar. Im Gegensatz dazu ist das Ergebnis des Experiments mit der frisch präparierten Matrix "GST-BK6B (n)" positiv.

Ausschlaggebend für den Verlust der Interaktion ist überraschenderweise die Lagerung der induzierten Bakterien bei -80 °C vor der Isolierung des GST-BK6B: Eine aus frischen Bakterien gewonnene BK6B-Affinitätsmatrix funktionierte auch nach 3 Wochen Lagerung bei 4 °C, während die für das Experiment in Abb. 13 eingesetzte BK6B-Matrix schon nach dreitägiger Lagerung bei 4 °C im Interaktionstest versagte (Ergebnisse nicht gezeigt). Demgegenüber hat die Dauer der Lagerung des T7-BKAP-B1-Proteins in Lösung bei -80 °C einen geringeren, aber merklichen negativen Einfluß auf die Stärke der Interaktion mit BK6B (vgl. jeweils die "PD1"-Spur mit der "PD2"-Spur in Abb. 15).

Im Gegensatz dazu verhielten sich die als Positivkontrolle verwendeten Proteine, GST-NK_v1.5 und T7-NK_v1.5, weitaus weniger problematisch. Die entsprechende Affinitätsmatrix ließ sich ohne weiteres sieben Wochen bei 4 °C und mindestens weitere 6 Monate bei -20 °C in 50 % Glycerol lagern. T7-NK_v1.5 zeigte auch nach über achtmonatiger Aufbewahrung in Lösung bei -80 °C eine Interaktion mit dieser GST-NK_v1.5-Matrix.

3.4.3 Die Interaktionsdomäne läßt sich auf die 76 C-terminalen Aminosäuren des BK eingrenzen

Biochemische Interaktionstests sind besonders aussagekräftig, wenn sie "in beiden Orientierungen" gelingen, d.h. wenn sowohl das immobilisierte Protein A den Partner B aus einer Lösung oder einem Lysat präzipitieren kann, als auch das immobilisierte Protein B den gelösten Partner A. Aus diesem Grund wurden Experimente analog 3.4.2, jedoch mit agarosegebundenem GST-BKAP-B1 und BK6B-Proteinen in Lösung unter den beschriebenen Standardbedingungen (2.2.4.2.1) durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß BK6B (sowohl mit T7-Epitop als auch mit Thioredoxin-Fusionsanteil) stark an die Glutathion-Agarose band (Abb. 14A). Variationen des Detergens (1 % Triton X-100; 0,1 - 1 % Deoxycholat; RIPA) oder der Ionenstärke (bis 0,5 M NaCl und 10 mM MgCl₂) hatten entweder keinen Einfluß auf die Bindung des Proteins an die Agarosematrix, oder unterbanden auch dessen Interaktion mit GST-BKAP-B1. Mit BK6B

konnte daher in dieser Orientierung ein solches GST-Kosedimentationsexperiment nicht durchgeführt werden.

Glutathion aktiviert neuronale und heterolog exprimierte BK-Kanäle der Ratte (Soh *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2002). Der Mechanismus, über den das Peptid seine Wirkung entfaltet, ist jedoch unbekannt. Es ist mit den Literaturdaten vereinbar, daß Glutathion mit einer spezifischen Bindungsstelle am Kanalprotein interagieren könnte; die beobachtete Bindung des BK-Fragments an die Glutathion-Agarose könnte also eine physiologische Bedeutung haben.

Um zu überprüfen, ob BK6B spezifisch Glutathion binden kann, wurde das reduzierte Tripeptid (γ -Glu-Cys-Gly) mit dem "Sulfolink"-System kovalent an aktivierter Agarose immobilisiert. Das System erlaubte es nämlich, unter identischen Bedingungen eine Kontrollmatrix herzustellen, an die nur Cystein anstelle von Glutathion gekoppelt war, und so zwischen einer spezifischen Interaktion mit Glutathion und einer unspezifischen Interaktion mit der Agarosematrix zu unterscheiden.



Abb. 14: Unspezifische Interaktion von BK6B mit der Agarosematrix.

A) BK6B-Fusionsprotein in Lösung ist für ein GST-*Pulldown*-Experiment ungeeignet. Die Agarose wurde mit gebundenem GST-BKAP-B1, GST oder ein äquivalentes Volumen ohne Fusionsprotein eingesetzt. T7-BK6B (nicht gezeigt) verhält sich genauso wie Trx(Thioredoxin)-BK6B.

B) BK6B bindet unspezifisch an die Agarosematrix. Reduziertes Glutathion wurde mit dem "Sulfolink"-System kovalent an aktivierte Agarose gekoppelt. An die Kontrollmatrix wurde in der gleichen Weise Cystein gekoppelt. 1,25 μg BK6B-Protein mit T7-Epitop bzw. 2,5 μg GST wurden mit 15 μl der jeweiligen Affinitätsmatrix inkubiert. Während GST spezifisch an die käufliche oder selbst hergstellte Glutathion-Agarose bindet, sedimentiert T7-BK6B gleichermaßen mit der Kontrollmatrix. Mit den Affinitätsmatrizes und gelöstem T7-BK6B wurde anschließend ein Interaktionstest durchgeführt (vgl. 2.2.4.2.1). GST bindet auschließlich an die käufliche oder selbst hergestellte Glutathion-Agarose, während BK6B gleichermaßen mit der Glutathion- wie der Kontrollmatrix präzipitiert (Abb. 14B). Diese Experimente zeigen, daß das BK-Fragment unspezifisch an die Agarosematrix bindet.





A) Im Bereich des bisher verwendeten Konstruktes BK6B wurden drei kürzere Fragmente hergestellt und deren Interaktion mit BKAP-B1 mittels GST-Kosedimentation getestet.

B) Kosedimentation der BK6B-Fragmente mit immobilisiertem GST-BKAP-B1. Die BK-Fragmente wurden als Fusionsprotein mit Thioredoxin (Trx) exprimiert. Keines der BK-Fragmente zeigt eine unspezifische Bindung an matrixgebundenes GST (diese Abb.) oder an die Agarosematrix allein (nicht gezeigt). Trx-BK6B-1 bindet stark an BKAP-B1, während das teilweise überlappende Trx-BK6B-3 mit deutlich niedrigerer Affinität, aber spezifisch interagiert. Trx-BK6B-2 sowie Trx allein (nicht gezeigt) interagieren nicht mit BKAP-B1.

C) Kosedimentation von T7-BKAP-B1 mit den immobilisierten BK-Fragmenten. Das Experiment bestätigt die unter B gezeigten Resultate.

Um dennoch die in Abb. 12 dargestellten Resultate in der umgekehrten Orientierung zu bestätigen, und um gleichzeitig die Interaktionsdomäne im BK-Kanal weiter einzugrenzen, wurden drei verschiedene, in der BK6B-Region (Aminosäuren 1049 - 1205) befindliche Konstrukte hergestellt (Abb. 15A): BK6B-1 (Aminosäuren 1130 - 1205, Primer 1501 und 1439), BK6B-2 (Aminosäuren 1049 - 1129, Primer 443 und 1502) und BK6B-3 (Aminosäuren 1087 - 1169, Primer 1503 und 1504). Diese Fragmente wurden als Thioredoxin-Fusionsproteine exprimiert, gereinigt und in der GST-Kosedimentation mit GST-BKAP-B1 getestet. Im Gegensatz zu BK6B interagiert keines der Fragmente unspezifisch mit der Agarosematrix (GST-Kontrollen in Abb. 15B und nicht gezeigte Ergebnisse). Trx-BK6B-1 bindet stark und Trx-BK6B-3 deutlich schwächer, aber dennoch signifikant an BKAP-B1. Trx-BK6B-2 (Abb. 15B) oder Trx allein (ohne Abbildung) assoziieren dagegen nicht mit BKAP-B1. BK6B-3, das jeweils etwa die Hälfte von BK6B-2 und BK6B-1 umfaßt, enthält also einen funktionsfähigen Teil der Interaktionsdomäne aus BK6B-1. Experimente in der umgekehrten Orientierung, also mit den immobilisierten BK-Fragmenten und gelöstem BKAP-B1 (Abb. 15C), bestätigen diese Ergebnisse.

Die GST-Kosedimentations-Experimente untermauern also die im Hefesystem gefundene Interaktion und zeigen, daß BKAP in der Lage ist, mit dem C-Terminus des BK-Kanals zu interagieren.

3.5 Expression und Lokalisierung von BKAP in Säugetierzellinien

Um das vollständige BKAP-Protein in Kulturen von Säugetierzellen zu exprimieren, wurde zunächst die BKAP-A1-cDNA mittels PCR (*Primer* 1847 und 1848, s. Anhang) im 5'-Bereich um 6 bp ergänzt, die für die fehlenden N-terminalen Aminosäuren Met und Tyr kodieren (vgl. Abb. 1 und Erläuterungen hierzu). Die cDNA wurde in den Expressionsvektor pcDNA3.1/Myc-His kloniert, der dem exprimierten Protein ein C-terminales Myc-Epitop anfügt. Die für die Transfektion bestimmte DNA wurde mit dem "Nucleobond"-System oder über eine CsCl-Gradienten gereinigt (2.2.1.2.4).

3.5.1 Western-Analyse von transient exprimiertem BKAP in COS-7-Zellen

Mit BKAP-A transfizierte COS-7-Zellen wurden zwischen zwei und vier Tagen nach der Transfektion mit RIPA-Puffer lysiert (2.2.5.3). Die löslichen und unlöslichen Fraktionen wurden dann mittels SDS-PAGE und anschließendem *Western Blot* analysiert.

Wie aus Abb. 16A hervorgeht, ist der überwiegende Anteil des exprimierten BKAP-A-Proteins in RIPA-Puffer löslich. (Bei der Interpretation des Experiments ist zu beachten, daß von dem RIPA-unlöslichen Material ein viermal größerer Anteil aufgetragen wurde als von den gelösten Proteinen im Überstand.) Wenn 2 % Triton X-100 anstelle der im RIPA-Puffer enthaltenen Detergenzien (2.2.5.3) verwendet wurde, verblieb hingegen der überwiegende Anteil des BKAP-A in der unlöslichen Fraktion (Ergebnis nicht gezeigt). Wenn die Zellen nach der Transfektion länger als 2 Tage inkubiert wurden, wurde keine höhere Ausbeute an BKAP-A erzielt, und der RIPA-unlösliche Anteil schien mit der Zeit zuzunehmen (vgl. Abb. 16A). Die Koexpression mit dem BK-Kanal, der sich im Vektor pcDNA3 befand, reduzierte stets das Expressionsniveau von BKAP, wie das Beispiel in Abb. 16B zeigt.

Der Myc-Antikörper detektiert eine Mehrfachbande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 48 - 50 kDa, während der berechnete Wert für BKAP-A-Myc einschließlich der fusionierten Aminosäuren 42,6 kDa beträgt. Sämtliche Signale sind spezifisch, da in Lysaten von COS-7-Zellen, die zur Kontrolle mit dem Vektor transfiziert worden waren, keine der Banden nachweisbar ist (Abb. 16B). Zudem detektierte ein BKAP-B1-Antiserum die gleichen Banden, wenn COS-Zellen mit BKAP-A-Myc transfiziert worden waren (ohne Abbildung). Mit dem durch Affinitätschromatigrafie gereinigten BKAP-B1-Antikörper wurde das gleiche Bandenmuster bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 43 - 45 kDa beobachtet, wenn die COS-Zellen BKAP-A ohne zusätzliche Fremdsequenzen exprimierten (vgl. 3.7.2).

In der *Western*-Analyse eines SDS-Gels mit besserer Auflösung (Abb. 16C) erkennt man insgesamt drei BKAP-spezifische Banden, deren relative Intensität zwischen verschiedenen Lysaten variierte. Die untere Bande war jedoch stets gleich stark oder stärker als die mittlere, und diese wiederum mindestens genauso intensiv wie die obere.



Abb. 16: Heterologe Expression von BKAP-A in COS7-Zellen.

BKAP-A im Expressionsvektor pcDNA3.1/Myc-His wurde transient in COS-7-Zellen transfiziert und die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. Die Proteine wurden in 10% igen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch getrennt und BKAP-A mit einem monoklonalen Myc-Antikörper im *Western Blot* detektiert.

A) Expression von BKAP-A in Abhängigkeit von der Wachstumszeit der transfizierten Zellen.

Die Lyse der Zellen erfolgte nach den angegebenen Inkubationszeiten. Jeweils 1/40 der löslichen ($\ddot{\mathbf{U}}$) und 1/10 der unlöslichen (\mathbf{S}) Fraktion des Lysats von Zellen aus einer 6 cm-Kulturschale wurden im *Western Blot* analysiert.

B) Koexpression des BK-Kanals reduziert das Expressionsniveau von BKAP-A. Die Zellen wurden mit BKAP-A, BKAP-A und BK (im pcDNA3-Vektor) oder nur mit dem pcDNA3-Vektor transfiziert, nach 3 Tagen lysiert und die Proteinkonzentration der löslichen Fraktion bestimmt. In jeder Spur befanden sich 7 μ g Gesamtprotein. Der Vergleich mit den Zellen, die mit dem Vektor transfiziert worden waren, demonstriert die Spezifität des Antikörpers für BKAP-Myc.

C) Die BKAP-Mehrfachbanden aus den Experimenten in A und B in höherer Auflösung. Es handelt sich um die gleichen Proben wie in A (45h, Ü) bzw. B (linke Spur), aber um einen anderen *Western Blot*. Die Ausschnitte verdeutlichen die Existenz von drei BKAP-Banden mit unterschiedlicher relativer Intensität in A und B.

Die Lyse der Zellen fand in Gegenwart von Proteaseinhibitoren bei 4 °C statt, und es erscheint unwahrscheinlich, daß das beobachtete Bandenmuster von BKAP durch Proteolyse zustandegekommen sein könnte, zumal in keinem *Western*-Experiment Degradationsprodukte von BKAP bei niedrigerem Molekulargewicht detektiert wurden. Die Möglichkeit der Proteolyse von BKAP ist anhand der vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht auszuschließen. Die Beobachtungen können auch mit zwei unabhängigen posttranslationalen Modifikationen des überexprimierten Proteins erklärt werden, die jeweils eine leichte, gleich große Verschiebung des Signals zu höherem Molekulargewicht bewirken.

3.5.2 BKAP zeigt ein intensives Kernsignal und kolokalisiert mit BK an der Plasmamembran von COS7-Zellen

Indirekte Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie sollten die subzelluläre Lokalisation des neu entdeckten Proteins aufdecken und zudem zeigen, ob es mit seinem potentiellen Interaktionspartner kolokalisiert, wenn die Proteine gemeinsam in einer Säugetierzelle exprimiert werden. Da bereits gezeigt wurde, daß BKAP mit dem C-Terminus des BK-Kanals *in vitro* interagieren kann, sollte damit geklärt werden, ob die *Voraussetzungen* für eine Wechselwirkung mit dem vollständigen Kanalprotein in einer lebenden Zelle gegeben sind. Ein solches Experiment kann auch Indizien für eine Proteininteraktion liefern, da die Koexpression eines Interaktionspartners manchmal die Lokalisation eines Proteins in der Zelle ändert.

Es wurde wieder die oben beschriebene Strategie der transienten Transfektion von COS-7-Zellen und der Detektion des BKAP-A mittels Myc-Epitop verfolgt. Für den BK-Kanal der Ratte, der ohne Fusionsanteile exprimiert wurde, stand ein affinitätsgereinigter polyklonaler Antikörper gegen ein C-terminales Epitop (Chemicon) zur Verfügung. Die Zweitantikörper waren mit Cy3 (rot) bzw. FITC (grün) fluoreszenzmarkiert.

Bei allen BKAP-transfizierten Zellen war ein intensives Signal im Nukleus zu beobachten. Für die meisten Aufnahmen mußte man eine Übersättigung des Detektors im Bereich des Zellkerns in Kauf nehmen, um das BKAP-Signal an der Plasmamembran sichtbar zu machen (Abb. 17), das nur bei einem Teil der Zellen detektierbar war. Das gleiche Resultat wurde erzielt, wenn das BKAP-A-Protein ohne Fusionsanteile exprimiert und mit einem spezifischen, affinitätsgereinigten BKAP-Antikörper detektiert wurde (vgl. 3.7.1). Die beobachtete subzelluläre Lokalisierung des Proteins wird demzufolge ausschließlich von den Eigenschaften des BKAP-Polypeptids bestimmt.

Die Koexpression der Proteine führte zu keiner erkennbaren Veränderung von deren räumlicher Verteilung in der Zelle (Abb. 17, untere Reihe). Jedoch war die Kolokalisation des BKAP-Signals mit dem BK-Signal an der Plasmamambran besonders auffällig. (Die gelbe Farbe im rechten Bild entsteht, wenn roter und grüner Kanal überlappen.) Zudem war auch intrazellulär einige Überlappung der Signale zu beobachten. Die Voraussetzungen für eine Interaktion von BKAP und BK in einer Säugetierzelle sind also erfüllt. Der kommerziell erhältliche BK-Antikörper detektiert zwei spezifische Banden, die ein apparentes Molekulargewicht von ca. 110 bzw. 115 kDa haben, in Lysaten von BK-transfizierten COS-7-Zellen (zur Spezifität dieses Antikörpers vgl. Abb. 24A.) Diese Banden sind deutlich erkennbar, wenn die Probe für die SDS-PAGE 15 min bei 55 °C denaturiert wurde (Abb. 18A, linke Spur). Die Banden bei 110 und 115 kDa gehen durch Aggregation vollständig verloren, wenn man 5 min auf 95 °C erhitzt; die Aggregate sind oberhalb des 250 kDa-Proteinstandards erkennbar (Abb. 18A, rechte Spur). Aus Abb. 18B geht hervor, daß auch kürzere Inkubationszeiten bei höheren Temperaturen (z.B. 5 min bei 75 °C) die Detektion des Kanalproteins stark beeinträchtigen. Im folgenden wurden BK enthaltende Proben 15 min bei 55 °C behandelt, und gebundene Proteine nach der GST-Kosedimentation ebenfalls unter diesen Bedingungen eluiert.

3.6.2 Reinigung eines BK-Antiserums

Der kommerzielle BK-Antikörper aus Kaninchen hatte sich als geeignet erwiesen, den in COS-7-Zellen exprimierten BK-Kanal in Western- und Immunfluoreszenz-Experimenten nachzuweisen. Bei den ersten Versuchen der GST-Kosedimentation des BK-Kanals trat das Problem auf, daß in der Western-Analyse der Eluate mit demselben BK-Antikörper unterhalb 150 kDa eine Vielzahl von Banden auftauchte, die in der Western-Analyse von Zellysaten nicht beobachtet worden waren, und die die Detektion des -möglicherweise mit BKAP kosedimentierten- Kanalproteins in den Eluaten verhinderten. Die störenden Signale traten gleichermaßen auf, wenn in einem Kontrollansatz anstelle eines Zellysates nur der entsprechende Puffer ohne Protein eingesetzt worden war (Abb. 19A); daher mußte es sich bei dem störenden Protein um das GST-BKAP-B1 handeln, das ja an die Affinitätsmatrix gebunden ist und nach der Kosedimentation mit eluiert wird. Eine auf das SDS-Gel geladene Menge von 2 µg GST-BKAP-B1 war ausreichend, um die Detektion des BK-Kanals zu verhindern; die zehnfache Menge GST zeigte hingegen keine störenden Banden bei höherem Molekulargewicht (Abb. 19A). Das "Schmieren" des Proteins im SDS-Gel ist also kein generelles methodisches Problem der SDS-PAGE, sondern auf die besonderen Eigenschaften von BKAP-B1 zurückzuführen.


Abb. 19: Der kommerziell erhältliche BK-Antikörper enthält GST-Antikörper, die die Detektion des Kanals nach der GST-Kosedimentation stören.

A) GST-*Pulldown*-Experiment mit insgesamt 10 μg immobilisiertem GST-BKAP-B1 oder 100 μg GST. Nur 1/5 des Eluats wurde analysiert. Es wurde entweder ein Triton X-100-Lysat von transfizierten COS-Zellen (+) oder das entsprechende Volumen Lysierpuffer ohne Protein (–) eingesetzt. Die Hauptmenge GST-BKAP-B1 befindet sich in der Nähe des erwarteten Molekulargewichtes von 59 kDa (in dieser Abb. nicht zu sehen). Ein Bruchteil der Proteinmenge schmiert im Bereich zwischen 150 und 60 kDa und ist ausreichend, um die *Western*-Detektion von BK zu verhindern. Das Kontrollprotein GST zeigt dieses Problem nicht (rechte Spur).

B) *Western*-Analyse von 1 ng gereinigtem Trx-BK6B-1 und 1 ng gereinigtem GST. Der BK-Antikörper zeigt eine starke Kreuzreaktion mit GST, obwohl er laut Hersteller eigens einem Reinigungsschritt unterzogen wurde, der die GST-Antikörper entfernen sollte.

Als nächstes stellte sich die Frage, warum GST-BKAP-B1 in der *Western*-Analyse für BK sichtbar ist. Als Negativkontrolle für die Kosedimentation mit GST-BKAP-B1 war ein Lysat von K_v1.1-Myc-transfizierten COS-7-Zellen verwendet worden, und demzufolge wurden die Eluate auch mit dem monoklonalen Myc-Erstantikörper und Maus-Zweitantikörper analysiert. Diese Antikörper zeigten keine Kreuzreaktion mit GST-BKAP-B1; das gleiche galt für den Kaninchen-Zweitantikörper, der zusammen mit dem BK-Antikörper verwendet worden war (ohne Abbildung). Die Ursache für das Problem mußte daher der BK-Antikörper sein. Abb. 19B demonstriert, daß er mit GST kreuzreagiert und GST nur wenig schwächer erkennt als das Antigen aus dem C-Terminus des BK. Das Produkt enthält also Antikörper gegen GST, obwohl die Angaben der Herstellers (Chemicon) besagen, daß die GST-Antikörper in einem speziellen Reinigungsschritt entfernt worden seien. GST-BK6B-1 (vgl. Abb. 15A) wurde als Antigen in Bakterien überexprimiert und ein Antiserum aus Kaninchen hergestellt (2.2.3.6). Reinigungsschritte mit immobilisiertem GST-Protein (2.2.3.7.1) halfen, die Kreuzreaktivität des Antiserums mit GST so stark zu reduzieren, daß es für die Analyse der GST-Kosedimentation geeignet war, wie in Abb. 20 gezeigt.



Abb. 20: Reinigung und Charakterisierung eines BK-Antiserums für die Detektion des BK in GST-*Pulldown*-Experimenten.

Zum Vergleich sind die *Western*-Analysen einer GST-BKAP-B1-Probe (1 μ g pro Spur) mit unbehandeltem oder gegen immobilisiertes GST gereinigtem Antiserum gezeigt, jeweils mit oder ohne Blockierung mit 50 μ g/ml GST. Reinigung und Blockierung hatten keinen Einfluß auf die Sensitivität des Serums gegenüber dem Antigen BK6B1 (untere Reihe).

Schon die Blockierung des ursprünglichen Antiserums mit 50 μ g/ml GST verminderte die störenden Signale im Bereich von 100 - 150 kDa. Durch die Reinigung des Serums konnten sie weitgehend vermieden werden, wobei die Blockierung des gereinigten Serums mit GST eine weitere, leichte Verbesserung brachte (Abb. 20, rechter Ausschnitt). Die verbliebene Kreuzreaktivität mit der GST-BKAP-B1-Hauptbande (Pfeil) erscheint akzeptabel, da von diesem Protein eine erhebliche Menge (1 μ g) auf die Membran transferiert worden ist. Die Sensitivität gegenüber dem BK-Antigen blieb unverändert (vgl. Detektionen von jeweils 1 ng Trx-BK6B1). Für die Analyse der Eluate aus der GST-Kosedimentation wurde daher das gereinigte und GST-blockierte Antiserum verwendet.

3.6.3 Der vollständige BK-Kanal kosedimentierte nicht mit GST-BKAP

Aus den vorhergehenden GST-Kosedimentationsexperimenten mit bakteriell exprimierten Proteinen war bekannt, daß BKAP und BK6B gleichermaßen in Gegenwart von 1 % wie 0,1 % (Standardbedingungen) Triton X-100 assoziieren, jedoch z.B. 1 % Deoxycholat die Interaktion verhindert (Ergebnisse nicht gezeigt).

Für einen Interaktionstest mit dem vollständigen Ionenkanal nach der gleichen Methode wurde BK aus transfizierten COS-7-Zellen solubilisiert (2.2.5.3), wobei ein Puffer mit 1 % Triton zum Einsatz kam, der bis auf die zugesetzten Proteaseinhibitoren mit dem geeigneten Pulldown-Puffer identisch war (2.2.4.2). Die Verwendung der "Complete Mini"-Proteaseinhibitormischung (Roche) gegenüber ausschließlich 10 µg/ml Leupeptin im Lysierpuffer hatte keinen erkennbaren Einfluß auf die Ausbeute und Qualität des gewonnenen BK-Proteins. Um eine besonders hohe Konzentration von BK zu erzielen, wurde die Lyse mit insgesamt 1 ml Puffer für zwei 10 cm-Zellkulturschalen durchgeführt. Die Lysate wurden für 2 Stunden, wie bei der Standard-Kosedimentation, oder über Nacht mit der GST-BKAP-B1-Affinitätsmatrix inkubiert. Abb. 21 zeigt die Ergebnisse der Western-Analyse der eingesetzten Lysate und der zugehörigen Eluate; in letzteren ist ebenfalls ein BK-Signal zu erwarten, falls zwischen dem Kanal und BKAP eine Interaktion stattgefunden hat. (21B war ein unabhängiges Experiment mit einer neu präparierten Affinitätsmatrix.) Die Filme wurden überbelichtet, um evtl. gebundenes BK-Protein in den Eluaten sichtbar zu machen; daher ist in den Lysatproben die typische Doppelbande nicht mehr erkennbar. Ein Teil des BK ist aggregiert und wird oberhalb 250 kDa detektiert, vermutlich aufgrund der hohen Proteinkonzentration im Lysat.

Das Resultat der Kosedimentation ist negativ, obwohl die verwendete Pufferlösung und die Bedingungen der Inkubation mit den *Pulldown*-Experimenten, bei denen die Kosedimentation der BK-Fragmente beobachtet wurde (3.4.2 und 3.4.3), praktisch identisch waren. Zum Vergleich sei auf das in Abb. 15 dargestellte, zu dem in Abb. 21 gezeigten analoge Experiment mit einer GST-BKAP-B1-Matrix und dem schwächer interagierenden der beiden positiven BK-Fragmente, nämlich Trx-BK6B-3, verwiesen (der äußerste C-Terminus, BK6B-1, zeigte hingegen eine wesentlich höhere Affinität zu BKAP-B1). 1/1000 des eingesetzten Trx-BK6B-3 lieferten ein *Western*-Signal, das um ein mehrfaches schwächer war als in Abb. 21 die BK-Signale in 1/800 des COS-Lysats;



Abb. 21: Versuche der GST-Kosedimentation des in COS-Zellen exprimierten, vollständigen BK-Kanals mit BKAP-B1.

Für einen Ansatz wurden 10 µg immobilisiertes GST-BKAP-B1 und das Lysat von zwei konfluenten 10 cm-Zellkulturschalen eingesetzt. Die Detektion des BK erfolgte mit dem GST-gereinigten und mit 50 µg/ml GST blockierten BK6B1-Antiserum; es wurden 1/800 des Lysats und 1/3 (A) bzw. 2/5 (B) des Eluats analysiert. Die Inkubationszeit der Affinitätsmatrix mit dem Lysat war entweder 2 Stunden (A) oder über Nacht (B; unabhängiges Experiment mit neu präparierter GST-BKAP-B1-Matrix). In beiden Fällen war kein gebundenes BK-Protein im Eluat detektierbar.

während jedoch in Abb. 21 absolut kein gebundener BK detektiert wird (mindestens 1/3 des eluierten Proteins analysiert), waren in Abb. 15 1/7 des eluierten Proteins ausreichend, um eine deutliche Bande des spezifisch interagierenden Trx-BK6B-3 zu erhalten. In den Experimenten mit dem vollständigen BK-Kanal wäre demzufolge selbst eine schwache Interaktion mit der BKAP-Matrix nachweisbar gewesen.

Es bleibt festzuhalten, daß unter experimentellen Bedingungen, bei denen reproduzierbar eine Interaktion zwischen BKAP-B1 und C-terminalen Fragmenten von BK stattfand, eine solche Bindung des vollständigen Kanalproteins an BKAP-B1 nicht nachweisbar war. Mögliche Gründe hierfür werden in Kap. 4.2 diskutiert.

3.7 Charakterisierung und subzelluläre Lokalisierung des nativen BKAP-Proteins

Um das native BKAP aus dem Gehirn der Ratte zu charakterisieren, sollte dessen apparentes Molekulargewicht im *Western Blot* bestimmt werden. Die grobe Fraktionierung des Gewebes in Membranen und lösliche Proteine kann hierbei erste Hinweise auf die subzelluläre Lokalisierung des Proteins geben. Mit einem ausreichend spezifischen Antikörper ist darüber hinaus die direkte Detektion des Proteins in Neuronen möglich, sodaß dessen Lokalisierung festgestellt werden kann.

Für die Untersuchung des nativen Proteins sollte zunächst ein BKAP-spezifischer Antikörper erzeugt werden. Aufgrund der Ähnlichkeit von BKAP und ssDP (Abb. 4) war es nicht möglich, als Antigen ein Fusionsprotein mit BKAP-Sequenzen zu generieren, die ausreichend verschieden von ssDP gewesen wären, um eine Kreuzreaktion des erzeugten Antikörpers mit ssDP auszuschließen. Da auch das native ssDP bisher nicht charakterisiert wurde, wurde BKAP-B1 als Antigen verwendet, um einen Antikörper zu gewinnen, der neben BKAP auch ssDP erkennen dürfte. Der Nachweis von ssDP-Transkripten im Gehirn wurde zwar bisher nur bei der adulten Maus erbracht (Raval-Fernandes *et al.*, 1999), es ist jedoch anzunehmen, daß ssDP auch -gemeisam mit BKAP- im Gehirn der adulten Ratte exprimiert wird.

3.7.1 Reinigung und Charakterisierung eines polyklonalen BKAP-Antikörpers

Zwei Kaninchen wurden mit GST-BKAP-B1 immunisiert (2.2.3.6) und die Sensitivität und Spezifität der Antiseren im *Western Blot* und in der Immunfluoreszenz getestet (ohne Abbildung). Das beste dieser Antiseren (Tier Nr. 3689, finale Blutung) wurde mit immobilisiertem Trx-BKAP-B1 affinitätsgereinigt (2.2.3.7.2).

Der so erhaltene polyklonale Antikörper erkannte BKAP-A sowohl in der *Western*-Analyse als auch in der Immunfluoreszenz von transfizierten COS-7-Zellen mit hoher Spezifität (Abb. 22). Die BKAP-Detektion ließ sich vollständig blockieren, wenn man den Antikörper über Nacht mit Trx-BKAP-B1 vorinkubierte (Abb. 22A, rechte Membran).

Die Proteinproben für die *Western*-Analyse in Abb. 23A wurden freundlicherweise von L. Cingolani zur Verfügung gestellt. Während mit dem unbehandelten Antiserum in Abb 23A auch mehrere intensive, unspezifische Signale auftreten, liefert der gereinigte Antikörper in Abb. 23B eine intensive, spezifische Bande und, abhängig von der Dauer der Belichtung des Films, schwache oder keine unspezifischen Signale. Die Bande befindet sich beim gleichen apparenten Molekulargewicht wie das BKAP-A-Signal aus transfizierten COS-7-Zellen (Abb. 23B); bei dem in der löslichen Fraktion der Gehirnpräparation detektierten Protein handelt es sich demnach um BKAP und möglicherweise auch um ssDP, das ebenso wie BKAP-A aus 361 Aminosäuren besteht und daher in der *Western*-Analyse beim gleichen apparenten Molekulargewicht wie BKAP-A erscheinen sollte.

Bereits bei der Analyse von heterolog exprimiertem BKAP-A-Myc waren drei nahe beieinanderliegende Banden im *Western Blot* zu beobachten, und es wurde bereits die Hypothese aufgestellt, daß es sich um verschieden posttranslational modifizierte Varianten von BKAP handeln könnte (3.5.1). Vergleicht man heterolog exprimiertes BKAP-A mit der nativen Bande in einem *Western Blot* mit höherer Auflösung (Abb. 23C), so fällt auf, daß sich das native Protein hauptsächlich in einer scharfen Bande auf der Höhe der oberen Bande im COS-7-Lysat befindet. Also scheint die obere, stets schwächste Bande aus den COS-7-Zellen dem nativen Zustand des Proteins zu entsprechen. Das ist im Einklang mit der Interpretation, daß heterolog exprimiertes BKAP nur unvollständig posttranslational modifiziert wird.

3.7.3 Der BK-Kanal, nicht aber BKAP, ist in der Membranfaktion aus Rattenhirn detektierbar

Als nächstes wurde untersucht, welche Proben aus der Fraktionierung des Gewebes den BK-Kanal enthielten. Wie in Abb. 24A ersichtlich, detektiert der BK-Antikörper (Chemicon) eine Doppelbande beim gleichen apparenten Molekulargewicht im Lysat transfizierter COS-Zellen und in der Membranfraktion aus Abb. 23A. Um die Qualität der in Abb. 23B verwendeten Membranpräparation zu überprüfen, wurden die Fraktionen ebenfalls mit dem BK-Antikörper analysiert (Abb. 24B), wobei BK wiederum in der Membranfraktion, aber nicht in der löslichen Fraktion nachweisbar war (Abb. 24B). Diese Verteilung des BK-Kanals ist im Falle einer gelungenen Membran-präparation zu erwarten.



Abb. 24: Western-Analyse des BK-Kanals aus dem Gehirn der Ratte.

A) Der BK-Antikörper erkennt eine BK-spezifische Doppelbande im Triton-Lysat (2 %) transfizierter COS-7-Zellen und in der Membranfraktion aus Rattenhirn (P20; Probe identisch mit der linken Spur in Abb. 23A). Proteinmengen: COS-7-Lysate jeweils 5 μ g; Gehirnmembranen 30 μ g. Die Identität der Bande unterhalb von 100 kDa ist unbekannt; sie wurde, mit unterschiedlicher Intensität, manchmal auch in Lysaten von BK-transfizierten COS-7-Zellen beobachtet. Oberhalb der BK-Signale befindet sich ein Protein, mit dem der BK-Antikörper kreuzreagiert.

B) Der BK-Kanal befindet sich erwartungsgemäß in der Membranfraktion, aber nicht in der löslichen Fraktion des Gehirns. Ein Teil der Proteinmenge verbleibt nach der Homogenisierung im 1000 x g-Sediment. Das gezeigte Experiment war, abgesehen vom Erstantikörper, identisch mit Abb. 23B.

Wenn BKAP ein Interaktionspartner des BK-Kanals *in vivo* ist, dann lautet die naheliegendste Annahme, daß eine solche Interaktion mit dem in einer Zellmembran lokalisierten Kanalprotein stattfindet. In einer Membranpräparation aus dem Gehirn sollte also BKAP zusammen mit BK angereichert sein.

Weder in der Membranpräparation aus dem Gehirn einer 20 oder 52 Tage alten Ratte war jedoch mit dem BKAP-B1-Antikörper beim apparenten Molekulargewicht von BKAP ein Signal zu erkennen (Abb. 23A bzw. 23B), während der BK-Kanal erwartungsgemäß in diesen Fraktionen zu finden war (P20: Abb. 24A rechte Spur; P52: Abb. 24B). Vielmehr zeigt der BKAP-B1-Antikörper eine intensive und spezifische Bande in der löslichen Fraktion. In Abb. 23B wurde auch das Sediment der ersten Zentrifugation (1000 x g) analysiert, das Gewebetrümmer und Zellkerne enthalten sollte. In dieser Fraktion ist ebenfalls ein, wenn auch sehr schwaches, Signal beim apparenten Molekulargewicht von BKAP zu sehen. Bei der Interpretation dieses Experiments ist zu den Ionenkanal zudem in Western Blots aus dem Gehirn der adulten Ratte (P20 oder P52).

Man erhielt jedoch keine eindeutigen, spezifischen Signale, auch wenn -anstelle des FITC-markierten- ein anderer Zweitantikörper mit dem Cy2-Farbstoff verwendet wurde, der stärkere Fluoreszenzsignale liefert (ohne Abbildung). Möglicherweise ist die Sensitivität des Erstantikörpers nicht ausreichend; außerdem könnte die Expression des BK-Kanals in diesen Neuronen vom Entwicklungsstadium abhängen.

3.8 Untersuchungen zum Kerntransport eines BK-Fragments

Die bisherigen Ergebnisse belegen einerseits, daß BKAP *in vitro* mit dem C-Terminus des BK-Kanals interagieren kann, deuten aber andererseits darauf hin, daß BKAP ein Kernprotein ist. Daher stellt sich die Frage, unter welchen Umständen eine direkte, funktionelle Interaktion zwischen den beiden Proteinen in der Zelle möglich ist, wenn die Partner in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert sind.

Es ist nicht auszuschließen, daß die Sensitivität der *Western*- und Immunfluoreszenzexperimente nicht ausreichte, um membranassoziiertes BKAP nachzuweisen; sollte BKAP in Neuronen an der Plasmamembran vorkommen, dann würde das dort lokalisierte Protein nur einen Bruchteil der gesamten Proteinmenge ausmachen. Im folgenden soll eine andere Hypothese aufgestellt und untersucht werden, die den scheinbaren Widerspruch zwischen den bisherigen Ergebnissen auflösen könnte: Ein C-terminales Fragment des BK-Kanals könnte durch eine spezifische Protease abgespalten und in den Zellkern transportiert werden, wo es eine funktionelle Interaktion mit BKAP eingehen könnte. Die folgenden Indizien führten, zusammen mit den oben genannten Argumenten, zu dieser Hypothese:

 Der intrazelluläre C-Terminus des BK-Kanals enthält dicht aufeinanderfolgend zwei potentielle Kerntransportsignale. Das eine ist vom klassischen Typ der Signalsequenz im T-Antigen des SV40-Virus (Kalderon *et al.*, 1984) und ähnelt zudem der Sequenz, die für den Kerntransport des humanen c-*myc*-Proteins verantwortlich ist (Dang und Lee, 1988); weiterhin besitzt BK ein zweigeteiltes Motiv, das homolog zu der prototypischen Sequenz in Nucleoplasmin (Dingwall und Laskey, 1991) ist (Abb. 26A).

- In Kap. 3.6.3 wurde bereits dargelegt, daß BKAP und BK in unterschiedlichen Fraktionen im Gehirn vorkommen: BKAP wurde in der löslichen, aber nicht in der Membranfraktion gefunden, während BK sich erwartungsgemäß in der Membran- und nicht in der löslichen Fraktion befand. Beim Betrachten des *Western Blots* in Abb. 24B, der mit dem kommerziellen, affinitätsgereinigten Antikörper gegen ein C-terminales Epitop des Kanalproteins durchgeführt wurde, fällt auf, daß eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 57 kDa zusammen mit dem BKAP-Signal in der löslichen Fraktion angereichert ist. Diese Bande könnte ein C-terminales, proteolytisches Fragment des BK-Kanals repräsentieren. Das berechnete Molekulargewicht für ein Kanalfragment, das von den Kernlokalisierungssignalen bis zum C-Terminus reicht, beträgt 56,2 kDa.
- Bei der Untersuchung des BK-Kanals aus der glatten Muskulatur von Säugetieren wurde mit mehreren unabhängigen Antikörpern ein C-terminales Kanalfragment mit ähnlichem Molekulargewicht beobachtet (Knaus *et al.*, 1995; Benkusky *et al.*, 2000). Die Literaturdaten weisen darauf hin, daß der intrazelluläre C-Terminus des Kanals, einschließlich der potentiellen Kerntransportsignale, durch eine Protease abgespalten werden kann.

3.8.1 Der intrazelluläre C-Terminus des BK-Kanals enthält ein funktionelles Kerntransportsignal

Die klassischen Konsensussignale für den Kerntransport umfassen eine oder mehrere Ansammlungen von basischen Aminosäuren, aber nicht jede basische Peptidsequenz ist tatsächlich in der Lage, die Kernlokalisierung eines Proteins zu induzieren. So ist z.B. jede der beiden Hälften des Kernlokalisierungssignales von Nucleoplasmin (vgl. Abb. 26A) für sich allein nicht funktionell (Dingwall und Laskey, 1991). Zunächst sollte daher die Frage geklärt werden, ob die im BK-Kanal identifizierten Motive (Abb. 26A) tatsächlich in der Lage sind, ein C-terminales Fragment des Proteins in den Nukleus einer Säugetierzelle zu dirigieren.





A) Vergleich der beiden potentiellen Kernlokalisierungssignale mit den prototypischen Sequenzen aus dem SV40 T-Antigen (KLS2) und Nucleoplasmin (KLS1). KLS2 ähnelt auch der minimalen Transportsequenz aus humanem c-*myc* (untere Zeile). Ähnliche Aminosäuren wurden eingerahmt und identische zusätzlich fett hervorgehoben.

B) Das Schema verdeutlicht die Lage des Sequenzausschnittes in A und der aufgrund der Sequenzanalyse hergestellten Konstrukte im C-Terminus des BK-Kanals. BK10E umfaßt den gesamten intrazellulären Bereich hinter der letzten Transmembrandomäne S6 (Aminosäuren 395 – 1205). BK-K2 (Aminosäuren 687 - 1205) enthält beide und BK-K1 (Aminosäuren 694 – 1205) nur das zweiteilige Kernlokalisierungssignal (KLS1). BK11A (Aminosäuren 725 - 1205) fehlen zur Kontrolle die fraglichen Transportsignale.

C) *Western*-Analyse der BK-Konstrukte in Lysaten von transfizierten COS-7-Zellen. Der Expressionsvektor pcDNA3 war so konstruiert, daß er den Proteinen ein HA-Epitop anfügte. Das Expressionsniveau der BK-Fragmente ist ähnlich. In der löslichen Fraktion aus dem Rattenhirn (rechte Spur), die sowohl Nukleo- als auch Zytoplasma beinhalten kann, detektiert der BK-Antikörper (Chemicon) eine Bande (Pfeil), die ein etwas größeres apparentes Molekulargewicht besitzt als das BK-K2-Konstrukt. In derselben Fraktion befand sich auch BKAP, vgl. Abb. 23B. Zu diesem Zweck wurde mittels PCR eine Serie von Konstrukten hergestellt, die keines (BK11A), nur eines (KLS1; BK-K1) oder beide potentielle Kernlokalisierungssignale (BK-K2) enthielten (Abb. 26B). Zusätzlich wurde der vollständige intrazelluläre Teil des Ionenkanals, BK10E, verwendet. Der *sense-Primer* (BK11A: 1976; BK-K1: 1975; BK-K2: 1974; BK10E: 1973; s. Anhang) fügte jeweils ein Start-Methionin sowie stromaufwärts eine Kozak-Konsensussequenz (Kozak, 1987) ein. Die Expression der BK-Fragmente erfolgte mit dem Vektor pcDNA3-HA (2.2.1.1.5), der den Proteinen ein Hämagglutinin-Epitop anfügte, in transfizierten COS-7-Zellen (2.2.5.2).

Wie die Western-Analyse von RIPA-Lysaten der transfizierten Zellen zeigt, detektiert der gegen ein Epitop im äußersten C-Terminus (Aminosäuren 1160 – 1205) gerichtete BK-Antikörper spezifische Banden der BK-Fragmente, die sich jeweils in der Nähe des erwarteten apparenten Molekulargewichts befinden (Abb. 26C). Zum Vergleich der apparenten Molekulargewichte wurde eine Probe der löslichen Fraktion aus dem Rattenhirn, die bereits in Abb. 24B zu sehen ist, auf derselben Membran analysiert. Diese Fraktion, in der BKAP detektiert worden ist, kann sowohl zytoplasmatische als auch nukleoplasmatische Proteine enthalten (3.6.3). Das potentielle Kanalfragment in dieser Fraktion befindet sich bei etwas höherem apparentem Molekulargewicht als das BK-K2-Protein, das durch das HA-Epitop um 11 Aminosäuren erweitert worden ist und den C-Terminus bis einschließlich der Kernlokalisierungssignale KLS1 und KLS2 umfaßt. Das endogene Fragment sollte also aufgrund seines apparenten Molekulargewichtes etwas länger als BK-K2 sein und die Kernlokalisierungssignale ebenfalls enthalten. Um die Identität der Bande in der Gehirnfraktion zu bestätigen, sollte die Western-Analyse mit mindestens einem weiteren unabhängigen Antikörper, dessen Epitop im C-Terminus des BK nicht mit dem des hier verwendeten Antikörpers überlappen darf, wiederholt werden. Ein solcher Antikörper stand jedoch bis zum Abschluß dieser Arbeit nicht zur Verfügung.

Abb. 27: KLS2 bewirkt den Transport des BK-C-Terminus in den Zellkern von Säugetierzellen.

COS-7-Zellen wurden mit den verschiedenen BK-Konstrukten im pcDNA3-HA-Vektor transfiziert (Fugene 6-Reagenz) und die Detektion mit dem kommerziellen BK-Antikörper und FITC-konjugiertem Zweitantikörper durchgeführt.

Linke Spalte: Repräsentative konfokale Aufnahmen (Schichtdicke ca. 1 µm), die das typische Verteilungsmuster des jeweiligen BK-Fragmentes widerspiegeln.

Rechte Spalte: Quantitative Auswertung eines repräsentativen von insgesamt drei Experimenten. Die Zellen wurden nach dem Verteilungsmuster des BK-Fragmentes fünf Gruppen zugeordnet: 1) nur Kernsignal sichtbar; 2) starkes Kernsignal und etwas cytoplasmatisches Signal; 3) intrazelluläres Signal mit deutlich unterscheidbarem Kern; 4) diffuse Verteilung innerhalb der Zelle; 5) Signal vom Kern weitgehend ausgeschlossen. Die Abbildungen in der linken Spalte zeigen Zellen des Typs 4 (BK11A), der Typen 3 und 4 (BK-K1), der Typen 2 und 3 (BK-K2) bzw. des Typs 5 (BK10E).



Abb. 29: Koexpression von BKAP fördert die Kernlokalisierung von C-terminalen BK-Fragmenten.

Quantitative Auswertung eines repräsentativen von zwei oder drei (BK-K2) unabhängigen Experimenten wie in Abb. 28. Generell war in Gegenwart von BKAP mehr BK-Fragment im Nukleus zu finden, wohingegen die Grundmuster der Verteilung der einzelnen Fragmente gegenüber deren Einzeltransfektion (vgl. Abb. 27) erhalten blieben.

4 Diskussion

Ionenkanäle erfüllen Schlüsselfunktionen in der Physiologie von Neuronen und vielen anderen Zellen, und ihre Aktivität wird auf vielfältige Weise durch Signalkaskaden moduliert. Die Spezifität regulatorischer Prozesse wird oft durch die räumliche Organisation der beteiligten Partner gewährleistet und beruht daher auf physikalischen Interaktionen zwischen Proteinen (Pawson und Scott, 1997). Ein weiterer, für die Funktion vor Ionenkanälen entscheidender Aspekt ist deren subzelluläre Lokalisierung, z.B. an der Postsynapse, die durch "Adapterproteine" gewährleistet wird (Sheng und Wyszysnski, 1997). Die in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse bestätigen, daß Ionenkanäle in der Zelle nicht als einzelne Proteine, sondern im Rahmen supramolekularer Proteinkomplexe vorliegen. So sind z.B. mit dem spannungsabhängigen Calciumkanal Ca_v1.2 der β_2 -adrenerge Rezeptor, ein G-Protein, Adenylatcyclase, Proteinkinase A und Phosphoprotein-Phosphatase 2A assoziiert (Davare et al., 2001). Bei der Charakterisierung des NMDA-Rezeptorkomplexes mit Hochdurchsatzmethoden wurden 77 verschiedene Proteine gefunden, u.a. Rezeptor-, Adapter-, Signal- und Zytoskelettproteine (Husi et al., 2000). Für das Verständnis der Funktion von Ionenkanälen in vivo ist es also von entscheidender Bedeutung, ihre Interaktionspartner und deren Funktion zu kennen.

Der calcium- und spannungsabhängige Kaliumkanal (BK), der vielfältige physiologische Aufgaben erfüllt (Kap. 1.3), ist auch von medizinischem Interesse: Ein Wirkstoff, der die Aktivität des BK-Kanals in einer Ca²⁺-abhängigen Weise erhöht, zeigte in einem Tiermodell für akuten ischämischen Schlaganfall einen neuroprotektiven Effekt (Gribkoff *et al.*, 2001). Darüber hinaus spielen BK-Kanäle in der glatten Muskulatur eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Kontraktionszustandes von Arterien (Brayden und Nelson, 1992; Jaggar *et al.*, 2000). Die Deletion der β 1-Untereinheit des BK-Kanals der Maus, die die Ca²⁺-Sensitivität des Kanals erhöht, führte zu erhöhtem arteriellem Tonus und erhöhtem Blutdruck (Brenner *et al.*, 2000a). Zu den Interaktionspartnern des BK-Kanals aus *Drosophila* zählen die regulatorischen Proteine Slob und dSlip (Xia *et al.*, 1998b; Schopperle *et al.*, 1998) sowie die Proteinkinase Src und die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (Wang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2002). Neben den Untereinheiten β 1 - β 4 (Knaus *et al.*, 1994; Wallner *et al.*, 2000; Weiger *et al.*, 2000) sind jedoch bis zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit keine Interaktionspartner des BK-Kanals von Säugetieren beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit wird ein neu entdecktes Protein charakterisiert, das BKAP (BK-assoziiertes Protein) genannt wurde, da es mit dem C-Terminus der α -Untereinheit des BK-Kanals der Ratte interagiert.

4.1 Charakterisierung von BKAP

BKAP wird im Rahmen dieser Arbeit erstmals beschrieben. Zunächst stellt sich die Frage, ob die vollständige kodierende Sequenz von BKAP kloniert wurde. Die folgenden Punkte sprechen dafür, daß das vorgeschlagene Methionin tatsächlich den Startpunkt der Translation darstellt:

- ESTs der Maus, die mit BKAP übereinstimmen und sich weiter in den 5'-Bereich erstrecken als die aus der cDNA-Bibliothek isolierten Klone, weisen ein Stopkodon auf, wenn der Leserahmen vom vorgeschlagenen Start-Methionin aus stromaufwärts fortgesetzt wird (Abb. 1).
- In Säugetierzellen überexprimiertes BKAP und das native Protein aus dem Gehirn der Ratte, das mit einem affinitätsgereinigten Antikörper gegen BKAP detektiert wurde, besitzen ein übereinstimmendes apparentes Molekulargewicht in der SDS-Gelelektrophorese (Abb. 23). Dies deutet darauf hin, daß das native Protein genauso viele oder nicht wesentlich mehr Aminosäuren umfaßt als die klonierte BKAP-Sequenz.
- Aus den Sequenzdaten des humanen Genoms wurde die Existenz eines Proteins vorhergesagt, das mit BKAP bis auf eine Aminosäure identisch ist ("hssDP2").

Neben BKAP wurden aus dem humanen Genom zwei weitere, ähnliche Proteine abgeleitet (NCBI-Datenbank, Castro und Nagarajan, unpubliziert). Eines davon, ssDP (*sequence-specific single-stranded-DNA-binding protein*), wurde bei der Suche nach Faktoren, die ein CT-reiches Element im Promotor des Kollagen-Gens binden, aus dem Hühnerembryo kloniert (Bayarsaihan *et al.*, 1998). Rekombinantes ssDP war in der Lage, mit einem einzelsträngigen Oligonukleotid aus Pyrimidinbasen *in vitro* zu interagieren (Bayarsaihan *et al.*, 1998). Zur Funktion des ssDP der Ratte (Raval-Fernandes *et al.*, 1999), dessen Aminosäuresequenz zu 81 % mit BKAP identisch ist (Abb. 4), liegen bisher keine weiteren Informationen vor.

Proteininteraktionen werden oft von modulartigen, in einer Vielzahl von Proteinen vorkommenden Domänen vermittelt, die unabhängig vom Rest des Proteins ihre korrekte Konformation einnehmen und für deren Bindungspartner eine Konsensus-Peptidsequenz definiert werden kann (Pawson, 1995). Die Spezifität der Bindung wird meist durch die das Konsensusmotiv flankierenden Regionen in den potentiellen Interaktionspartnern bestimmt (Pawson, 1995; Dalgarno *et al.*, 1998). In der Aminosäure-Sequenz von BKAP befinden sich drei prolinreiche Motive mit mehreren aufeinanderfolgenden "PXXP"-Sequenzen (Abb. 2), die eine linksgängige Polyprolin-Helix ausbilden und typische Bindungsmotive für SH3 ("Src homology 3")-Domänen darstellen (Pawson und Scott, 1997; Dalgarno *et al.*, 1998). SH3-Domänen sind weit verbreitete und gut charakterisierte Interaktionsmodule, die zuerst in Tyrosinkinasen der Src-Familie identifiziert wurden und 55 - 70 Aminosäuren umfassen (Dalgarno *et al.*, 1998).

Das alternative Spleißen von RNA-Transkripten ist ein in Eukaryonten weit verbreiteter Mechanismus, um von einem einzigen Gen Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften zu erzeugen (Breitbart *et al.*, 1987). Insgesamt konnten sieben Spleißvarianten von BKAP im Gehirn der Ratte identifiziert werden (Abb. 3). Zwei der drei prolinreichen Proteininteraktionsmotive befinden sich in alternativen Exons, so daß z.B. in Neuronen BKAP-Varianten synthetisiert werden, die mit unterschiedlichen Kombinationen von Bindungspartnern assoziieren könnten.

Die *in situ*-Hybridisierung läßt erkennen, daß das BKAP-Transkript im Gehirn der adulten Ratte weit verbreitet ist. Eine starke Expression von BKAP ist z.B. in Cortex, Hippocampus, Caudate putamen, Habenula und olfaktorischem Bulbus zu beobachten (3.3.3). Darüber hinaus wird BKAP auch im peripheren Nervensystem exprimiert, wie mit RT-PCR auf mRNA aus Neuronen der oberen Zervikalganglien (SCG-Neuronen) gezeigt wurde (Abb. 8B). Das BKAP-Transkript hat eine Länge von ca. 1,8 kb und kommt in allen Geweben vor, die im *Northern Blot* untersucht wurden. Das Expressionsniveau variiert jedoch außerordentlich und liegt am höchsten in Testis und im Gehirn, und am niedrigsten in Milz und Leber (Abb. 7).

Die Expression von ssDP wurde bislang nicht systematisch untersucht und nur in Großhirn, Hirnstamm und Niere der adulten Maus überprüft und nachgewiesen. Interessanterweise zeigte die *Northern*-Analyse von ssDP zwei Transkriptbanden bei ca. 2 kb und ca. 3 kb (Raval-Fernandes *et al.*, 1999). Da ssDP aus einer cDNA-Bibliothek

kloniert worden ist, die aus Cortex der adulten Ratte stammt (Raval-Fernandes *et al.*, 1999), ist anzunehmen, daß BKAP und ssDP im Gehirn der Ratte gemeinsam vorkommen.

BKAP-A besteht aus 361 Aminosäuren und besitzt ein apparentes Molekulargewicht von ca. 44 kDa (Abb. 23), das wahrscheinlich aufgrund der prolinreichen Abschnitte des Proteins höher liegt als der berechnete Wert: Prolinreiche Proteine zeigen eine Verschiebung zu höherem apparentem Molekulargewicht in der SDS-PAGE (Furthmayr und Timpl, 1971; Harlow und Lane, 1999). Die *Western*-Analyse des in Säugetierzellen (COS-7) überexprimierten BKAP-A zeigt insgesamt drei spezifische Banden im Abstand von ca. 1 kDa, die wahrscheinlich von posttranslationalen Modifikationen des Proteins herrühren (Abb. 16C). Da BKAP-A in den Zellen überexprimiert wurde, erscheint es plausibel, daß eine endogene Enzymaktivität nur einen Teil der produzierten Proteine modifizieren kann.

In transfizierten Säugetierzellen (COS-7 oder HEK-293) ist BKAP-A, im Einklang mit seiner Ähnlichkeit zu einem DNA-bindenden Protein, überwiegend im Zellkern lokalisiert. Darüber hinaus sind BKAP-Signale im Zytoplasma und in COS-7-Zellen auch an der Plasmamembran zu beobachten (Abb. 17).

BKAP enthält -ebenso wie ssDP- kein klassisches Kernlokalisierungssignal aus basischen Aminosäuren. Eine solche Signalsequenz kommt jedoch bei weitem nicht in allen Kernproteinen vor: Abhängig davon, welchem Kernkompartiment die Proteine zuzuordnen sind, identifizierte das Analyseprogramm PSORT solche Kerntransportsignale in 80-86 %, 62 % bzw. 41 % der Proteine (Bickmore und Sutherland, 2002). Es existieren also weitere, bislang nur unzureichend untersuchte Mechanismen für den Kerntransport von Proteinen.

Das native Protein wurde mit einem affinitätsgereinigten BKAP-Antikörper untersucht, der in der löslichen Fraktion aus dem Rattenhirn eine scharfe und spezifische Bande detektiert, die der BKAP-A-Bande aus COS-7-Zellen mit dem höchsten apparenten Molekulargewicht entspricht (Abb. 23). In der löslichen Fraktion der Membranpräparationen können sowohl Proteine aus dem Zytoplasma als auch Proteine aus dem Nukleoplasma enthalten sein. In Hippocampus-Neuronen markierte der BKAP-Antikörper den Nukleus (Abb. 25). (Auf die Konsequenz dieser Befunde für eine mögliche Interaktion von BKAP mit dem BK-Kanal *in vivo* wird Kap. 4.2 eingegangen.)

Trotz der Ähnlichkeit von BKAP und ssDP wurde die BKAP-mRNA im *Northern Blot* und in der *in situ*-Hybridisierung spezifisch detektiert. Die DNA-Sequenzen von BKAP und ssDP sind im Bereich der *Northern*-Sonde zu mindestens 25 % verschieden (vgl. 3.3.1). Die Berechnung der Schmelztemperatur von DNA-Hybriden nach Anderson und Young (vgl. 2.2.2.3.2) ergibt, daß unter den stringenten Waschbedingungen bei 25 % Sequenzabweichung die Schmelztemperatur um durchschnittlich 17 °C (mindestens 4 °C und höchstens 27 °C) niedriger liegt als die letzte Waschtemperatur des *Blots* (65 °C). Für die Spezifität des BKAP-*Northerns* spricht auch, daß bei der *Northern*-Analyse des ssDP-Transkriptes aus Gehirn und Niere der Maus neben einer Bande bei ca. 2 kb noch eine weitere, intensivere Bande bei ca. 3 kb auftrat (Raval-Fernandes et al., 1999). Letztere Bande wäre im Falle einer Kreuzreaktion der BKAP-Sonde mit ssDP auch in Abb. 7 zu erwarten, war jedoch auch nach längerer Belichtung des Films nicht erkennbar.

Für die *in situ*-Hybridisierung wurden drei verschiedene Oligonukleotidsonden von der BKAP-cDNA abgeleitet, die identische Resultate lieferten (3.3.3). Im Bereich derjenigen Sonde, die sich in die 3'-untranslatierte Region erstreckt, sind die cDNA-Sequenzen von BKAP und ssDP zu 59 % verschieden; deshalb ist eine Kreuzreaktion dieser Sonde mit der ssDP-mRNA nahezu ausgeschlossen.

Aufgrund der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen der beiden Proteine und weil ssDP in der *Western*-Analyse beim gleichen apparenten Molekulargewicht wie BKAP-A erwartet wird (beide Proteine umfassen 361 Aminosäuren), besteht die Möglichkeit, daß der BKAP-Antikörper auch ssDP erkennen könnte.

Die in Kap. 3.7 gezeigten Ergebnisse haben auch dann Bestand, wenn der verwendete Antikörper mit ssDP kreuzreagieren sollte. Die Interpretation der Daten und die im nächsten Kapitel gezogenen Schlußfolgerungen würden nur dann berührt, wenn BKAP wesentlich niedriger exprimiert wäre als ssDP, und demzufolge die Ergebnisse der Membranpräparationen (Abb. 23) und der Immunzytochemie (Abb. 25) ausschließlich die subzelluläre Lokalisierung von ssDP widerspiegelten. Die Experimente mit BKAPtransfizierten COS-7-Zellen zeigen jedoch, daß der gereinigte Antikörper BKAP mit hoher Sensitivität und Spezifität erkennt, und zwar sowohl im *Western Blot* als auch in der Immunfluoreszenz (Abb. 22). Aus der *in situ*-Hybridisierung geht hervor, daß BKAP in fast allen Regionen des Gehirns der adulten Ratte exprimiert wird (Abb. 9). Dies spricht für die Annahme, daß das Protein in den Proben, die der biochemischen Fraktionierung des adulten Rattenhirnes entstammen, in einer Konzentration vorliegen sollte, die ausreicht, um es im Western Blot mit dem BKAP-Antikörper nachzuweisen. Auch das im Gehirn insgesamt hohe Expressionsniveau der BKAP-mRNA, das im *Northern Blot* erkennbar ist (Abb. 7), deutet darauf hin, daß BKAP im Gehirn ein häufig vorkommendes Protein sein dürfte.

Die *in situ*-Hybridisierung zeigt eine relativ starke Expression von BKAP in den Neuronen des Hippocampus (Abb. 10). (Allerdings ist eine Korrelation zwischen der Menge an Transkript und der Menge an Protein in der Zelle nicht immer gegeben.) In transfizierten Säugetierzellen wurde die überwiegende Menge des BKAP, mit oder ohne angefügtes Myc-Epitop, spezifisch im Nukleus nachgewiesen. Daher erscheint es plausibel, daß es sich bei dem Protein, das der BKAP-Antikörper im Nukleus der Hippocampus-Neuronen erkennt (Abb. 25), vollständig oder zum Teil um endogenes BKAP handelt.

Um die Frage einer möglichem Kreuzreaktion des gereinigten BKAP-Antikörpers mit ssDP experimentell zu klären, soll der Antikörper gegenüber ssDP-transfizierten COS-7-Zellen im *Western Blot* und in der Immunfluoreszenz charakterisiert werden, sobald die ssDP-cDNA zur Verfügung steht. Die Ergebnisse dieser Experimente können aus Termingründen nicht mehr in die vorliegende Arbeit aufgenommen werden.

4.2 Interaktion von BKAP mit dem BK-Kanal

BKAP wurde mit dem Zwei-Hybrid-System in der Hefe als potentieller Interaktionspartner des BK-Kanals identifiziert (3.1.1). BKAP hat zwar Ähnlichkeit mit einem DNA-bindenden Protein; die Möglichkeit, daß BKAP aufgrund eventueller DNA-Bindungseigenschaften ein falsch positives Ergebnis im Zwei-Hybrid-System zeigen könnte, ist jedoch aufgrund der durchgeführten Kontrollexperimente auszuschließen (3.2.1). BKAP-A1 und -B1 wurden zusammen mit dem leeren Vektor pLexN getestet und es wurde gezeigt, daß BKAP das BK-Fragment als Interaktionspartner benötigt, um die Transkription der Reportergene zu starten.

Mit dem Zwei-Hybrid-System gewonnene Ergebnisse sollten, um als aussagekräftig zu gelten, mit einer weiteren, unabhängigen Methode verifiziert werden (Brent und Finley,

1997; Wyszynski und Sheng, 1999). Die *Filter Overlay*-Methode (Li *et al.*, 1992; Wyszynski und Sheng, 1999) ist offenbar nicht geeignet, um eine Interaktion zwischen BKAP und BK nachzuweisen (3.3.1). Es ist ohne weiteres vorstellbar, daß durch die Bindung eines Partners an die Membran die Interaktionsdomäne unzugänglich wird, oder daß die korrekte Faltung der Proteine auf der Membran unmöglich ist.

Die GST-Kosedimentationsexperimente mit rekombinanten Proteinen bestätigen, daß BKAP mit verschieden langen C-terminalen Konstrukten des BK assoziiert (3.3.2). Die Interaktionsdomäne wurde auf 76 Aminosäuren im äußersten C-Terminus des Kanalproteins eingeschränkt (3.3.3). Es konnten drei Transkripte des BK-Kanals aus dem Gehirn der Ratte isoliert werden, die verschiedene C-terminale Enden aufwiesen (S. Hülsemann, 1998); daher stellt sich die interessante Frage, ob jede dieser BK-Varianten in der Lage ist, mit BKAP zu interagieren.

Prolinreiche Sequenzen in K_v1.5, die eine große Ähnlichkeit zu den entsprechenden Interaktionsmotiven in der BKAP-Sequenz aufweisen, sind für die Assoziation des Kaliumkanals mit der SH3-Domäne der Src-Kinase verantwortlich (Holmes et al., 1996). BK enthält jedoch keine Sequenzabschnitte, die Ähnlichkeit mit einer SH3-Domäne (oder einer anderen bekannten Proteininteraktionsdomäne) aufweisen, wie die Analyse der Aminosäuresequenz der von uns verwendeten BK-Spleißvariante mit zwei verschiedenen Programmen ergab: dem "CDART"-Werkzeug (conserved domain architecture retrieval tool) in der NCBI-Datenbank und der Profilsuche in der "Prosite"-Datenbank (Falquet et al., 2002). Daher sollten die prolinreichen Proteininteraktionsmotive von BKAP keine Rolle für die Assoziation mit BK spielen. Eines dieser Motive befindet sich in einem alternativen Exon, von dem gezeigt wurde, daß es nicht an der Bindung der BK-Fragmente beteiligt ist (vgl. Abb. 2, Abb. 5 und Abb. 12; auch bezüglich der Stärke der Interaktion wurde kein Unterschied zwischen den Spleißvarianten BKAP-A und BKAP-B beobachtet). Die Verkürzung von BKAP am N-Terminus um 115 Aminosäuren beließ die anderen beiden Motive intakt und führte dennoch zum vollständigen Verlust der Interaktion im Zwei-Hybrid-System (Abb. 6A). Auch diese Motive sind folglich nicht an der Bindung des BK-Konstruktes beteiligt oder allein nicht ausreichend für eine detektierbare Wechselwirkung. Folglich steht mindestens eine, wahrscheinlich aber alle drei, der prolinreichen Bindungstellen in BKAP-A für die Interaktion mit bislang unbekannten Partnern zur Verfügung.

Die Interaktionsstudien mit rekombinanten Proteinen (Kap. 3.4.2 und 3.4.3) bestätigen also die Ergebnisse aus dem Hefesystem und zeigen, daß BKAP mit C-terminalen Fragmenten des BK-Kanals *in vitro* interagiert. Darüber hinaus stellen sie klar, daß die Interaktion zwischen BKAP und BK direkt, d.h. ohne ein drittes, verbrückendes Protein stattfinden kann.

Die Interaktion zweier Proteine unter physiologischen Bedingungen setzt selbstverständlich voraus, daß sie in ein und derselben Zelle im gleichen Entwicklungsstadium exprimiert werden. Daher soll zunächst die Verteilung der Transkripte von BK und BKAP im Gewebe der adulten Ratte verglichen werden.

Die *in situ*-Hybridisierung für den BK-Kanal im Gehirn der Ratte (3.3.3) zeigt in Übereinstimmung mit den publizierten Ergebnissen der *in situ*-Hybridisierung und der Immunhistochemie (Chang *et al.*, 1997; Knaus *et al.*, 1996) eine starke Expression des BK z.B. in Cortex, Hippocampus, Habenula, Caudate putamen, olfaktorischem Bulbus, Teilen des Thalamus und in den Purkinjezellen des Kleinhirns, wo auch BKAP exprimiert wird (Abb. 9). Der BK-Kanal wird ebenfalls gemeinsam mit BKAP in Neuronen aus den oberen Zervikalganglien exprimiert, wie in dieser Arbeit mittels RT-PCR (Abb. 8B) sowie mit elektrophysiologischen und pharmakologischen Methoden (Smart *et al.*, 1987; Davies *et al.*, 1996) nachgewiesen wurde.

BK wird im Gehirn sehr stark exprimiert und ist zudem, ebenso wie BKAP, in nichtneuronalem Gewebe weit verbreitet. Die *Northern*-Analyse ließ sowohl für BK (Tseng-Crank *et al.*, 1994) als auch für BKAP (Abb. 7) ein mittleres bis hohes Expressionsniveau in Skelettmuskel und Niere erkennen. In Testis, wo große Mengen des BKAP-Transkriptes detektiert wurden (Abb. 7), wurde BK ebenfalls nachgewiesen (Chang *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1998). Herz und Lunge lieferten ein intensives BKAP-Signal (Abb. 7), in diesen Geweben kommt jedoch nur wenig BK-mRNA vor (Tseng-Crank *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1997). (In einer anderen Studie wurde gar kein BK-Transkript im Herz detektiert; Wallner *et al.*, 1995). Während in der Milz BKAP sehr schwach und BK relativ stark exprimiert ist, kommen in der Leber beide Transkripte in geringen Mengen vor (Abb. 7; Tseng-Crank *et al.*, 1994).

Es bleibt festzuhalten, daß BKAP und BK in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie in den meisten der untersuchten nicht-neuronalen Gewebe koexprimiert werden. Die bemerkenswerte Ähnlichkeit der Expressionsmuster von BKAP und BK deutet darauf hin, daß die beiden Proteine funktionell zusammenwirken könnten. Ferner kommt BKAP in einigen, wenn auch wenigen Gehirnregionen bzw. Neuronen vor, in denen BK nicht exprimiert wird, z.B. den Körnerzellen im Cerebellum (Abb. 10). Daher sollte die physiologische Funktion dieses Proteins nicht zwingend an die Interaktion mit der α -Untereinheit des BK gekoppelt sein, wie im Falle einer "klassischen" Untereinheit eines Ionenkanals zu erwarten wäre.

Wenn BKAP ein Interaktionspartner des BK *in vivo* ist, dann ist zu erwarten, daß das Protein gleichermaßen mit dem gesamten Ionenkanal wie mit den C-terminalen Kanalfragmenten interagiert. Unter Bedingungen, die nahezu identisch mit den Kosedimentationen der bakteriell exprimierten BK-Konstrukte mit BKAP (3.3.2 und 3.3.3) waren, wurde jedoch keine Kosedimentation des vollständigen, in COS-7-Zellen exprimierten Kanalproteins mit BKAP beobachtet (Abb. 21). Hierfür kommen verschiedene Ursachen in Betracht:

- BK könnte in den heterologen Zellen posttranslational modifiziert und so in einen Zustand überführt werden, in dem die Bindung von BKAP "abgeschaltet" ist. Die Regulation von Proteininteraktionen durch Phosphorylierung ist weit verbreitet und findet beispielsweise bei den Bindungspartnern von SH2-Domänen (Pawson, 1995) und Proteinen der 14-3-3-Familie statt (Muslin *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1999). (Allerdings scheint die typische Situation zu sein, daß -wie in den genannten Fällen- die Interaktion mittels Phosphorylierung aktiviert wird.) Innerhalb der Region, die für die Bindung von BKAP verantwortlich ist (Abb. 15), wurden funktionell relevante Phosphorylierungsstellen sowohl der Proteinkinase G (Alioua *et al.*, 1998; Fukao *et al.*, 1999) als auch der Proteinkinase C (Zhou *et al.*, 2001) nachgewiesen. Eine solche Modifikation von BKAP an den Ionenkanal signalabhängig steuert.
- Ein endogenes Protein der COS-7-Zellen könnte mit BKAP um die Interaktionsdomäne am BK-Kanal konkurrieren. Da BK in diesen Zellen überexprimiert wird, müßte der hypothetische endogene Interaktionspartner sehr stark exprimiert werden, um die Mehrzahl der Bindungsstellen abzusättigen.
- Die Tetramerisierung der α-Untereinheiten des BK-Kanals (Quirk und Reinhart, 2001) oder regulatorische Sequenzen innerhalb jeder einzelnen α-Untereinheit

(N-terminal zum Konstrukt BK11A, Abb. 12) könnten die Interaktion mit BKAP verhindern. Eine Konkurrenz von intermolekularen und intramolekularen Wechselwirkungen spielt z.B. beim Aktivierungsmechanismus der Src-Kinase eine wichtige Rolle (Pawson und Scott, 1997) und wurde in ähnlicher Weise bei der Interaktion des Adapterproteins SAP97 mit seinem Bindungspartner GKAP beobachtet (Wu *et al.*, 2000).

Um eine physikalische Interaktion *in vivo* eingehen zu können, müssen die beiden potentiellen Bindungspartner nicht nur gemeinsam exprimiert werden, sondern auch im gleichen Kompartiment der Zelle lokalisiert sein. Neben dem intensiven Kernsignal von BKAP in COS-7-Zellen wurde auch eine Kolokalisierung des Proteins mit dem BK-Kanal an der Plasmamembran beobachtet (Abb. 17). In Hippocampus-Neuronen wurde BKAP jedoch nur im Zellkern und nicht an der Membran detektiert (Abb. 25). Zudem war BKAP zwar in der löslichen Fraktion aus dem Gehirn der Ratte, jedoch nicht in der Membranfraktion zusammen mit dem BK-Kanal nachweisbar (Abb. 23 und 24). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß BKAP normalerweise eine Funktion im Nukleus von Neuronen ausübt, und werfen die Frage auf, unter welchen Bedingungen eine Interaktion von BKAP mit dem BK-Kanal *in vivo* stattfinden könnte. Zwei mögliche Erklärungsansätze werden in diesem und im nächsten Kapitel dargelegt.

Die subzelluläre Lokalisierung von BKAP könnte einem unbekannten regulatorischen Mechanismus unterliegen, der unter bestimmten Bedingungen, abhängig z.B. von dem neuronalen Zelltyp, dem Entwicklungsstadium oder zellulären Signalwegen, eine funktionelle Interaktion des Proteins mit dem membranständigen BK-Kanal erlaubt. Daher könnte ein so geringer Anteil der gesamten BKAP-Proteinmenge im Gehirn an der Plasmamembran lokalisiert sein, daß die Nachweisgrenze der *Western*-Analyse nicht erreicht wurde. In den Hippocampus-Neuronen war allerdings auch dann, wenn die Detektion des Fluoreszenzsignals im Bereich des Zellkerns stark übersättigt war, kein BKAP-Signal an der Plasmamembran erkennbar, sondern nur schwache intrazelluläre Signale (3.7.4). In diesen Neuronen, die 2 Tage in Kultur gehalten worden waren, könnte die Lokalisierung von BKAP entwicklungsabhängig reguliert sein, sodaß das Protein möglicherweise erst in einem späteren Stadium an der Membran vorkommt. In proliferierenden Zellen könnte die Interaktion von BKAP mit BK vom Zellzyklus abhängen, da während der Mitose die Kernmembran aufgelöst wird und Kernproteine somit ins Zytosol gelangen.

Die bisherigen Ergebnisse schließen also nicht aus, daß BKAP neben einer Funktion im Zellkern unter besonderen Bedingungen eine physiologische Funktion an der Plasmamembran ausüben könnte, indem es direkt mit dem BK-Kanal interagiert. Seit einigen Jahren sind Beispiele für Proteine bekannt, die sowohl Aufgaben im Nukleus erfüllen, als auch *in vivo* mit Membranproteinen, speziell auch mit Kaliumkanälen, assoziieren. So wurde z.B. von drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander eine Interaktion des Transkriptionsfaktors ATF4/CREB2 mit dem GABA_B-Rezeptor beschrieben (White *et al.*, 2000; Nehring *et al.*, 2000; Vernon *et al.*, 2001). ATF4 wurde in Neuronen aus dem Cortex und dem Hippocampus der Ratte sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma und in den Dendriten nachgewiesen, wo das Protein mir dem GABA_B-Rezeptor koloka-lisiert ist. Baclofen, ein Agonist des GABA_B-Rezeptors, beeinflußt die subzelluläre Lokalisierung von ATF4 in neuronalen Zellkulturen, wobei in Cortex- und Hippocampus-Neuronen ein gegensätzlicher Effekt (verstärkte bzw. verminderte Kernlokalisierung von ATF4 nach der Behandlung der Zellen mit Baclofen) beobachtet wurde (White *et al.*, 2000; Vernon *et al.*, 2001).

KChAP ("K⁺ channel-associated protein") interagiert mit den spannungsabhängigen Kaliumkanälen K_v1.3, K_v2.1 und K_v4.3 und erhöht die Expression funktioneller Kanäle an der Plasmamembran sowie die Gesamtmenge der Kanalproteine in heterologen Expressionssystemen (Xenopus-Oozyten und L-Zellen der Maus; Wible et al., 1998; Kuryshev et al., 2000). Daher wurde vorgeschlagen, daß KChAP ein Chaperon für diese Kaliumkanäle darstellen könnte. Das heterolog exprimierte Protein wurde mittels Immunfluoreszenz überwiegend im Zellkern und außerdem im Zytoplasma, aber nicht an der Membran nachgewiesen (Wible et al., 1998; Kuryshev et al., 2000). KChAP gehört zur PIAS ("protein inhibitor of activated STAT")-Genfamilie und ist bis auf eine zusätzliche Kassette von 35 Aminosäuren mit PIAS3 identisch, das mit dem aktivierten STAT3-Protein assoziiert und die Bindung von STAT3 an DNA und die Aktivierung der Transkription verhindert (Chung et al., 1997; Kuryshev et al., 2000). Endogenes PIAS3 ist in humanen Zellinien sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert, wo es mit dem Kernprotein Gfi-1 interagieren kann, wodurch der inhibitorische Effekt von PIAS3 auf die STAT3-abhängige Transkription aufgehoben wird (Rödel et al., 2000).

Kürzlich wurde zudem eine Familie von Ca²⁺-bindenden Proteinen, die sog. KChIPs ("K_v channel-interacting proteins") beschrieben, die mit den α -Untereinheiten der K_v4-Kanäle assoziieren und die Kanalfunktion modulieren (An *et al.*, 2000). KChIP3 interagiert außerdem mit einer C-terminalen Domäne des Membranproteins Presenilin, die eine Rolle in der Apoptose spielt (Buxbaum *et al.*, 1998), und wurde als DREAM ("DRE-antagonist modulator") bezeichnet, da das Protein in Ca²⁺-abhängiger Weise an bestimmte regulatorische DNA-Sequenzen binden und die Transkription regulieren kann (Carrion *et al.*, 1999; Spreafico *et al.*, 2001). In transfizierten Säugetierzellen (HEK-293) ist KChIP3 diffus verteilt und wurde nur in Gegenwart des Interaktionspartners K_v4.3 an der Plasmamembran beobachtet. KChIP3 wird in den HEK-Zellen palmitoyliert, und die Mutation von zwei Cysteinresten verhindert sowohl die Palmitoylierung des Proteins als auch dessen Lokalisierung an der Plasmamembran (Takimoto *et al.*, 2002). Die Acylierung/Deacylierung stellt daher einen möglichen Mechanismus dar, um die subzelluläre Lokalisierung von KChIP3 zu regulieren, und so dessen Funktionen in verschiedenen Kompartimenten der Zelle zu steuern.

Darüber hinaus sind Proteine bekannt, die sowohl an Synapsen als auch im Nukleus von Neuronen lokalisiert sein können, wie CASK (Hsueh *et al.*, 2000) und BEGAIN (Yao *et al.*, 2002).

Die genannten Beispiele unterstreichen, daß ein und dasselbe Protein unterschiedliche und zunächst widersprüchlich erscheinende Funktionen in verschiedenen Kompartimenten haben kann. Dies könnte auch für BKAP zutreffen.

4.3 Hat der C-Terminus des BK-Kanals eine regulatorische Funktion im Zellkern?

Der C-Terminus des BK-Kanals enthält zwei potentielle Kerntransportsignale (Abb. 26A). Diese Beobachtung führte zu einer anderen Hypothese, die den scheinbaren Widerspruch auflösen könnte, der zwischen der Interaktion von BKAP mit BK *in vitro* und der beoachteten Lokalisierung von BKAP in Neuronen besteht: Die intrazelluläre Domäne des BK-Kanals könnte unter definierten physiologischen Bedingungen proteolytisch gespalten und das C-terminale Fragment in den Nukleus transportiert werden, wo es regulatorische Funktionen ausüben könnte, z.B. indem es mit BKAP interagiert. Diese Hypothese wird von einigen Literaturdaten zum BK-Kanal und ersten gezielten Experimenten (Kap. 3.8) gestützt, worauf im folgenden noch eingegangen wird. Die Idee, daß ein proteolytisches Fragment eines Membranproteins eine regulatorische Funktion im Zellkern ausüben könnte, ist keineswegs grundsätzlich neu. Dieses Prinzip der Signalübertragung von der Plasmamembran in den Nukleus wurde in der Literatur bereits im Zusammenhang mit einer Reihe von Membranproteinen, jedoch bislang keinem Ionenkanal, beschrieben (Ebinu und Yankner, 2002). Das am besten untersuchte Beispiel ist zweifellos der Rezeptor Notch, der eine Schlüsselrolle in der Zelldifferenzierung spielt (Chan und Jan, 1998). Die Aktivierung des Rezeptors führt dazu, daß die intrazelluläre Domäne durch Proteolyse freigesetzt wird, mit regulatorischen Proteinen im Nukleus assoziiert und die Transkription bestimmter Gene auslöst (Chan und Jan, 1998). In ähnlicher Weise wird der intrazelluläre Teil des Transmembranproteins APP ("amyloid precursor protein") proteolytisch abgespalten und bildet im Zellkern einen Proteinkomplex mit einem Adapterprotein und einer Histon-Acetyltransferase, der die Transkription stimulieren kann (Cupers et al., 2001; Cao und Südhof, 2001). Auch die Rezeptor-Tyrosinkinase ErbB-4 wird proteolytisch prozessiert, und ein intrazelluläres Fragment, das ein potentielles Kernlokalisierungssignal enthält, gelangt in den Nukleus (Ni et al., 2001).

Die erste Voraussetzung für die Gültigkeit der Hypothese ist, daß in der Zelle eine Protease existiert, die die Abspaltung eines definierten BK-Fragments katalysiert. Dafür gibt es in der Literatur Hinweise: Bei der Reinigung der α-Untereinheit des BK aus glatter Muskulatur des Rindes wurde das Protein bei einem bestimmten chromatografischen Schritt stets in ein Hauptfragment von ca. 65 kDa und ein C-terminales Fragment von ca. 48 kDa gespalten (Kaus et al., 1995). Ein C-terminales BK-Fragment wurde zudem mit zwei unabhängigen Antikörpern in der Western-Analyse von Uterusgewebe der Maus nachgewiesen (Benkusky et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Membranpräparation aus dem Rattenhirn mit einem Antikörper gegen ein Epitop im C-Terminus des BK analysiert und eine Bande von ca. 57 kDa detektiert, die in der löslichen Fraktion zusammen mit BKAP angereichert war (Abb. 23 und 24); das berechnete Molekulargewicht eines BK-Fragments vom ersten Kernlokalisierungssignal bis zum äußersten C-Terminus beträgt 56,2 kDa. (Die Abweichung des apparenten Molekulargewichts von der Literaturangabe ist unproblematisch, da zum einen die experimentelle Bestimmung dieses Werts zwangsläufig ungenau ist und zum anderen gewebebedingte Unterschiede in Betracht kommen.) Die Identität dieses potentiellen BK-Fragments im Gehirn der Ratte sollte jedoch mit mindestens einem weiteren Antikörper oder besser durch Aminosäuresequenzierung bestätigt werden. Weiterhin bleibt zu klären, ob die Proteolyse von BK tatsächlich in einer lebenden Zelle stattfinden kann.

Die zweite Voraussetzung für die Gültigkeit der Hypothese ist, daß der Transport eines proteolytisch abgespaltenen BK-Fragmentes in den Zellkern erfolgen kann. Wie in Kap. 3.8.1 gezeigt wird, enthält der C-Terminus des BK ein basisches Motiv, daß dem klassischen Kernlokalisierungssignal im SV40 T-Antigen (Kalderon *et al.*, 1984) stark ähnelt (Abb. 26A), und die weitgehende Lokalisierung eines entsprechenden BK-Fragments im Nukleus von COS-7-Zellen bewirkt (Abb. 27). Das Kontrollfragment ohne Kernlokalisierungssignale zeigte hingegen ein diffuses Verteilungsmuster in der gesamten Zelle, in Übereinstimmung damit, daß Proteine zwischen 40 und 60 kDa noch -wenn auch verlangsamt- durch die Kernporen diffundieren können (Görlich und Mattaj, 1996; Nigg, 1997). Einmal abgespalten, kann der C-Terminus des BK also in den Zellkern gelangen. Koexpression von BKAP führte dazu, daß das BK-Fragment noch stärker im Nukleus akkumuliert wurde (Abb. 27), ein Indiz dafür, daß die beiden Proteine im Nukleus physikalisch interagieren könnten. Andere Methoden wie z.B. FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) sind geeignet, eine Interaktion von BKAP mit den BK-Fragmenten im heterologen System direkt zu zeigen.

Interessanterweise weist ein weiterer Kaliumkanal, *Ether-á-go-go* oder Eag (Brüggemann *et al.*, 1993), im intrazellulären C-Terminus ein Kerntransportsignal auf, das sich in Studien an heterologen Zellen als funktionell erwiesen hat (L. Pardo, persönliche Mitteilung). Eag beeinflußt die Zellproliferation und weist ein onkogenes Potential auf (Pardo *et al.*, 1999); die molekularen Grundlagen dieses Phänomens sind aber weitgehend unbekannt. Es gibt also Hinweise darauf, daß die intrazellulären Domänen verschiedener Ionenkanäle direkt an der Kommunikation zwischen Plasmamembran und Nukleus beteiligt sein könnten. Die Aufklärung eines solchen Mechanismus hätte grundsätzliche Bedeutung für das Verständnis der Signalübertragung in der Zelle.

5 Zusammenfassung

Für das Verständnis der physiologischen Funktionen von Ionenkanälen ist es von grundlegender Bedeutung, die Identität und die Funktion der Proteine zu kennen, die mit dem Ionenkanal physikalisch interagieren. In dieser Arbeit wird ein neu entdecktes Protein charakterisiert, das mit dem intrazellulären C-Terminus des Ca²⁺- und spannungsabhängigen Kaliumkanals (BK-Kanal) der Ratte im Hefe-Zwei-Hybrid-System interagiert, und daher BK-assoziiertes Protein (BKAP) genannt wurde.

Interaktionsstudien mit rekombinanten Proteinen bestätigen, daß BKAP direkt und spezifisch an C-terminale Fragmente des BK-Kanals bindet. Die Position der Interaktionsdomäne wurde auf die 76 C-terminalen Aminosäuren des Kanalproteins eingeschränkt.

BKAP-mRNA wird in allen untersuchten Geweben, besonders stark in Testis und Gehirn, exprimiert. Die Expressionsmuster von BKAP und BK im Gehirn der adulten Ratte zeigen eine bemerkenswerte Ähnlichkeit. BKAP-Transkripte kommen in mindestens 7 Spleißvarianten im Gehirn der Ratte vor. Die Variante BKAP-A besteht aus 361 Aminosäuren, und das transient in Säugetierzellen (COS-7) exprimierte Protein hat ein apparentes Molekulargewicht von 44 kDa, übereinstimmend mit BKAP aus dem Gehirn der Ratte.

In COS-7-Zellen überexprimiertes BKAP-A befindet sich überwiegend im Nukleus, aber auch an der Plasmamembran, wo es mit dem BK-Kanal kolokalisiert ist. In Hippocampus-Neuronen wurde BKAP jedoch nur im Nukleus, aber nicht an der Plasmamembran detektiert, und in der Membranfraktion aus dem Gehirn der Ratte, in der der BK-Kanal stark angereichert ist, war BKAP nicht nachweisbar. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von BKAP zu einem Einzelstrang-DNA bindenden Protein (ssDP), sind jedoch unerwartet im Hinblick auf die Interaktion des Proteins mit dem BK-Kanal.

Im C-Terminus des BK-Kanals befindet sich ein klassisches Kerntransportsignal, das in Säugetierzellen (COS-7) funktionell ist. In Gegenwart von koexprimiertem BKAP-A werden C-terminale BK-Fragmente verstärkt im Nukleus der COS-7-Zellen akkumuliert. Die Hypothese, daß der C-Terminus des BK-Kanals *in vivo* proteolytisch abgespalten werden könnte und gemeinsam mit BKAP eine regulatorische Funktion im Nukleus ausüben könnte, wird diskutiert.

6 Literaturverzeichnis

Adelman, J.P., Shen, K-Z., Kavanaugh, M.P., Warren, R.A., Wu Y-N., Lagrutta, A., Bond, C.T. und North, R.A. (1992). Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. Neuron **9**: 209-16.

Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P. und Toro, L. (1998). The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K+ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. J. Biol. Chem. **273**: 32950-6.

An, W.F., Bowlby, M.R., Betty, M., Cao, J., Ling, H.P., Mendoza, G., Hinson, J.W., Mattsson, K.I., Strassle, B.W., Trimmer, J.S. und Rhodes, K.J. (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. Nature **403**: 553-6.

Anderson, M.L. und Young, B.D. (1985). Quantitative Filter Hybridisation. In: Nucleic acid hybridisation, a practical approach. Editor: Hames BD., Higgins SJ. IRL Press.

Anwer, K., Oberti, C., Perez, G.J., Perez-Reyes, N., McDougall, J.K., Monga, M., Sanborn, B.M., Stefani, E. und Toro, L. (1993). Calcium-activated K+ channels as modulators of human myometrial contractile activity. Am. J. Physiol. **265**: C976-85.

Atkinson, N.S., Robertson, G.A. und Ganetzky, B. (1991). A component of calciumactivated potassium channels encoded by the Drosophila slo locus. Science **253**: 551-5.

Bayarsaihan, D., Soto, R.J. und Lukens, L.N. (1998). Cloning and characterization of a novel sequence-specific single-stranded-DNA-binding protein. Biochem. J. **331**:447-52.

Benkusky, N.A., Fergus, D.J., Zucchero, T.M. und England, SK. (2000). Regulation of the Ca2+-sensitive domains of the maxi-K channel in the mouse myometrium during gestation. J. Biol. Chem. **275**: 27712-9.

Bickmore, W.A. und Sutherland, H.G. (2002). Addressing protein localization within the nucleus. EMBO J. **21**: 1248-54.

Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523.

Blatz, A.L. und Magleby, K.L. (1986). Single apamin-blocked Ca2+-activated K+ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. Nature **323**: 718-20.

Brayden, J.E. und Nelson, M.T. (1992). Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. Science **256**: 532-35.

Breitbart, R.E., Andreadis, A. und Nadal-Ginard, B. (1987). Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. Annu. Rev. Biochem. **56**: 467-95.

Brenner, R., Perez, G.J., Bonev, A.D., Eckman, D.M., Kosek, J.C., Wiler, S.W., Patterson, A.J., Nelson, M.T. und Aldrich, R.W. (2000a). Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. Nature **407**: 870-6.

Brenner, R., Jegla, T.J., Wickenden, A., Liu, Y. und Aldrich, R.W. (2000b). Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. J. Biol. Chem. **275**: 6453-61.

Brent, R. und Finley, R.L. Jr. (1997). Understanding gene and allele function with twohybrid methods. Annu. Rev. Genet. **31**: 663-704.

Brewer G.J., Torricelli J., Evege, E.K. und Price, P.J. (1994). Neurobasal medium/B27 supplement: a new serum-free medium combination for survival of neurons. Focus **16**:6-9.

Brüggemann, A., Pardo, L.A., Stühmer, W. und Pongs, O. (1993). Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K+ and Ca2+ and modulated by cAMP. Nature **365**: 445-8.

Butler A., Tsunoda S., McCobb D.P., Wei A. und Salkoff L. (1993). mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. Science **261**:221-4.

Buxbaum, J.D., Choi, E.K., Luo, Y., Lilliehook, C., Crowley, A.C., Merriam, D.E. und Wasco, W. (1998). Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. Nat. Med. **4**: 1177-81.

Cao, X. und Südhof, T.C. (2001). A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. Science **293**: 115-20.

Carrion, A.M., Link, W.A., Ledo, F., Mellstrom, B. und Naranjo, J.R. (1999). DREAM is a Ca2+-regulated transcriptional repressor. Nature **398**: 80-4.

Chan, Y.M. und Jan, Y.N. (1998). Roles for proteolysis and trafficking in notch maturation and signal transduction. Cell **94**: 423-6.

Chang, C.P., Dworetzky, S.I., Wang, J. und Goldstein, M.E. (1997). Differential expression of the alpha and beta subunits of the large-conductance calcium-activated potassium channel: implication for channel diversity. Brain Res. Mol. Brain Res. **45**: 33-40.

Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. Anal. Biochem. **162**: 156-159.

Christophersen, P. (1991). Ca(2+)-activated K+ channel from human erythrocyte membranes: single channel rectification and selectivity. J. Membr. Biol. **119**: 75-83.

Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. und Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. Science **278**: 1803-5.

Chung, S., Reinhart, P., Martin, B. L., Brautigan, D., und Levitan, I.B. (1991). Protein kinase activity closely associated with a reconstituted calcium-activated potassium channel. Science **253**: 560-2.

Chung, S., Jung, W., Uhm, DY., Ha, T.S. und Park, C.S. (2002). Glutathione potentiates cloned rat brain large conductance Ca(2+)-activated K+ channels (rSlo). Neurosci. Lett. **318**: 9-12.

Coetzee, W.A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M.S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz de Miera, E. und Rudy, B. (1999). Molecular Diversity of K+ Channels. Annals of the New York Academy of Sciences **868**: 233-85.

Cupers, P., Orlans, I., Craessaerts, K., Annaert, W. und De Strooper, B. (2001). The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture. J. Neurochem. **78**: 1168-78.

Dalgarno, DC., Botfield, MC. und Rickles, RJ. (1997). SH3 domains and drug design: ligands, structure, and biological function. Biopolymers **43**: 383-400.

Dang, C.V. und Lee, W.M. (1988). Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. Mol. Cell. Biol. **8**: 4048-54.

Davare, M.A., Avdonin, V., Hall, D.D., Peden, E.M., Burette, A., Weinberg, R.J., Horne, M.C., Hoshi, T. und Hell, J.W. (2001). A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca2+ channel Cav1.2. Science **293**: 98-101.

Davies, P.J., Ireland, D.R., und McLachlan, E.M. (1996). Sources of Ca2+ for different Ca2+-activated K+ conductances in neurones of the rat superior cervical ganglion. J. Physiol. **495**: 353-66.

DiChiara, T.J. und Reinhart, P.H. (1997). Redox modulation of hslo Ca2+-activated K+ channels. J. Neurosci. **17**: 4942-55.

Dingwall, C. und Laskey, R.A. (1991). Nuclear targeting sequences - a consensus? Trends Biochem. Sci. **16**: 478-81.

Duttweiler, H.M. (1996). A highly sensitive and non-lethal beta-galactosidase plate assay for yeast. Trends Genet. **12**: 340-1.

Dworetzky, S.I., Boissard, C.G., Lum-Ragan, J.T., McKay, M.C., Post-Munson, D.J., Trojnacki, J.T., Chang, C.P. und Gribkoff V.K. (1996). Phenotypic alteration of a human BK (hSlo) channel by hSlobeta subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation. J. Neurosci. **16**: 4543-50.

Ebinu, J.O. und Yankner, B.A. (2002). A RIP tide in neuronal signal transduction. Neuron **34**: 499-502.

Elkins, T., Ganetzky, B. und Wu, C-F. (1986). A Drosophila muation that eliminates a calcium-dependent potassium current. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 8415-9.

Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C.J., Hofmann, K. und Bairoch, A. (2002). The PROSITE database, its status in 2002. Nucleic Acids Res. **30**: 235-8.

Fields S. und Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature **340**: 245-6.

Fukao, M., Mason, H.S., Britton, F.C., Kenyon, J.L., Horowitz, B. und Keef, K.D. (1999). Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. J. Biol. Chem. **274**: 10927-35.

Furthmayr, H. und Timpl, R. (1971). Characterization of collagen peptides by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide electrophoresis. Anal. Biochem. **41**: 510-6.

Gardos, G. (1958). The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta **30**: 653-54.

Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. Cell **23**: 175-82.

Gola, M., und Crest, M. (1993). Colocalization of active KCa channels and Ca2+ channels within Ca2+ domains in helix neurons. Neuron **10**: 689-99.

Görlich, D. und Mattaj, I.W. (1996). Nucleocytoplasmic transport. Science 271:1513-8.

Gribkoff, V.K., Starrett, J.E. Jr., Dworetzky, S.I., Hewawasam, P., Boissard, C.G., Cook, D.A., Frantz, S.W., Heman, K., Hibbard, J.R., Huston, K., Johnson, G., Krishnan, B.S., Kinney, G.G., Lombardo, L.A., Meanwell, N.A., Molinoff, P.B., Myers, R.A., Moon, S.L., Ortiz, A., Pajor, L., Pieschl, R.L., Post-Munson, D.J., Signor, L.J., Srinivas, N., Taber, M.T., Thalody, G., Trojnacki, J.T., Wiener, H., Yeleswaram, K. und Yeola, S.W. (2001). Targeting acute ischemic stroke with a calcium-sensitive opener of maxi-K potassium channels. Nat. Med. **7**: 471-7.

Harlow, E. und Lane, D. (1999). Using Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hill J., Donald K.A., Griffiths D.E. und Donald G. (1991). DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. Nucleic Acids Res. **19**: 5791.

Hollenberg, S.M., Sternglanz, R., Cheng, P.F. und Weintraub, H. (1995). Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. Mol. Cell Biol. **15**: 3813-22.

Holmes, T.C., Fadool, D.A., Ren, R. und Levitan, I.B. (1996). Association of Src tyrosine kinase with a human potassium channel mediated by SH3 domain. Science **274**: 2089-91.

Hsueh, Y.P., Wang, T.F., Yang, F.C. und Sheng, M. (2000). Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. Nature **404**: 298-302.

Hülsemann, S. (1998). Klonierung und Charakterisierung eines für einen Calciumabhängigen Kaliumkanal kodierenden Gens. Dissertation, Cuvillier Verlag Göttingen.

Husi, H., Ward, M.A., Choudhary, J.S., Blackstock, W.P. und Grant, S.G. (2000). Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. Nat. Neurosci. **3**: 661-9.

Ishii, T.M., Silvia, C., Hirschberg, B, Bond, C.T., Adelman, J.P. und Maylie, J. (1997). A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 11651-6.

Issa, N.P. und Hudspeth, A.J. (1994). Clustering of Ca2+ channels and Ca(2+)-activated K+ channels at fluorescently labeled presynaptic active zones of hair cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 7578-82.

Jaggar, J.H., Porter, V.A., Lederer, W.J. und Nelson, M.T. (2000). Calcium sparks in smooth muscle. Am. J. Physiol. Cell Physiol. **278**: C235-56.

Jan, L.Y. und Jan, Y.N. (1997). Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. Annu. Rev. Neurosci. **20**: 91-123.

Joiner, W.J., Wang, L.Y., Tang, M.D. und Kaczmarek, L.K. (1997). hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 11013-8.

Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D. und Smith, A.E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. Cell **39**: 499-509.

Kennelly, P.J. und Krebs, E.G. (1991). Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. J. Biol. Chem. **266**: 15555-8.

Knaus, H.G., Folander, K., Garcia-Calvo, M., Garcia, M.L., Kaczorowski, G.J., Smith, M. und Swanson, R. (1994). Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca(2+)-activated K+ channel from smooth muscle. J. Biol. Chem. **269**: 17274-8.

Knaus, H.G., Eberhart, A., Koch, R.O., Munujos, P., Schmalhofer, W.A., Warmke, J.W., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L. (1995). Characterization of tissue-expressed alpha subunits of the high conductance Ca(2+)-activated K+ channel. J. Biol. Chem. **270**: 22434-9.

Knaus, H.G., Schwarzer, C., Koch, R.O., Eberhart, A., Kaczorowski, G.J., Glossmann, H., Wunder, F., Pongs, O., Garcia, M.L. und Sperk, G. (1996). Distribution of high-conductance Ca(2+)-activated K+ channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals. J. Neurosci. **16**: 955-63.

Köhler, M., Hirschberg, B., Bond, C.T., Kinzie, J.M., Marrion, N.V., Maylie, J. und Adelman, J.P. (1996). Small conductance, Calcium-Activated Potassium Channels from Mammalian Brain. Science **273**: 1709-14.

Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucleic Acids Res. 15: 8125-48.

Kuryshev, Y.A., Gudz, T.I., Brown, A.M. und Wible, B.A. (2000). KChAP as a chaperone for specific K(+) channels. Am. J. Physiol. Cell Physiol. **278**: C931-41.

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

Lewis, S.E. und Konradi, C. (1996). Analysis of DNA-Protein Interactions in the Nervous System Using the Electrophoretic Mobility Shift Assay. Methods **10**: 301-11.

Li, M., Jan, Y.N. und Jan, L.Y. (1992). Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. Science **257**: 1225-30.

Logsdon, N.J., Kang, J., Togo, J.A., Christian, E.P. und Aiyar J. (1997). A Novel Gene hKCa4, encodes the Calcium-activated Potassium Channel in Human T Lymphocytes. J. Biol. Chem. **272**: 32723-6.

Marty, A. (1981). Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. Nature **291**: 497-500

McManus, O.B. (1991). Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium. J. Bioenerg. Biomembr. **23**: 537-60.

Meera, P, Wallner, M., Jiang, Z und Toro, L. (1997). Large conductance voltage- and calcium-dependent K+ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 14066-71.

Meera, P., Wallner, M. und Toro, L. (2000). A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca2+-activated K+ channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 5562-7.

Minvielle-Sebastia, L. und Keller, W. (1999). mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. Curr. Opin. Cell Biol. **11**:352-7.

Mullen, R.J., Buck, C.R. und Smith, A.M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. Development **116**: 201-11.

Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M. und Shaw, A.S. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. Cell **84**:889-97.

Nakai, K. und Kanehisa, M. (1992). A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. Genomics 14: 897-91.

Navaratnam, D.S., Bell, T.J., Tu, T.D., Cohen, E.L. und Oberholtzer, J.C. (1997). Differential distribution of Ca2+-activated K+ channel splice variants among hair cells along the tonotopic axis of the chick cochlea. Neuron **19**: 1077-85.

Nehring, R.B., Horikawa, H.P., El Far, O., Kneussel, M., Brandstatter, J.H., Stamm, S., Wischmeyer, E., Betz, H. und Karschin, A. (2000). The metabotropic GABA(B) receptor directly interacts with the activating transcription factor 4. J. Biol. Chem. **275**: 35185-91.

Nelson, M.T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L.F., Bonev, A.D., Knot, H.J. und Lederer, W.J. (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. Science **270**: 633-7.

Ni, C.Y., Murphy, M.P., Golde, T.E. und Carpenter, G. (2001). Gamma-Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. Science **294**: 2179-81.

Nigg, E.A. (1997). Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. Nature **386**: 779-87.

Okamoto, M. und Südhof, T.C. (1997). Mints, Munc18-interacting proteins in synaptic vesicle exocytosis. J. Biol. Chem. **272**: 31459-64.

Pardo, L.A., del Camino, D., Sanchez, A., Alves, F., Brüggemann, A., Beckh, S. und Stühmer, W. (1999). Oncogenic potential of EAG K(+) channels. EMBO J. **18**: 5540-7.

Pawson, T. (1995). Protein modules and signalling networks. Nature 373: 573-80.

Pawson, T. und Scott, J.D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. Science **278**: 2075-80.

Ramanathan, K., Michael, T.H., Jiang, GJ., Hiel, H. und Fuchs, P.A. (1999). A molecular mechanism for electrical tuning of cochlear hair cells. Science **283**: 215-7.
Raval-Fernandes, S., Kickhoefer, V.A. und Rome, L.H. (1999). Cloning of a cDNA encoding a sequence-specific single-stranded-DNA-binding protein from Rattus norvegicus. Gene **237**: 201-7.

Reinhart, P.H., Chung, S. und Levitan, I. B. (1989). A family of calcium-dependent potassium channels from rat brain. Neuron **2**: 1031-41.

Reinhart, P.H., Chung, S., Martin, B.L., Brautigan, D.L., und Levitan, I.B. (1991). Modulation of calcium-activated potassium channels from rat brain by protein kinase A and phosphatse 2A. J. Neurosci. **11**: 1627-35.

Reinhart, P.H. und Levitan, I.B. (1995). Kinase and phosphatase activities intimately associated with a reconstituted calcium-dependent potassium channel. J. Neurosci. **10**: 3664-84.

Roberts, W.M., Jacobs, R.A., und Hudspeth, A.J. (1990). Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. J. Neurosci. **10**: 3664-84.

Robitaille, R. und Charlton, M.P. (1992). Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. J. Neurosci. **12**: 297-305.

Rödel, B., Tavassoli, K., Karsunky, H., Schmidt, T., Bachmann, M., Schaper, F., Heinrich, P., Shuai, K., Elsasser, H.P. und Moroy, T. (2000). The zinc finger protein Gfi-1 can enhance STAT3 signaling by interacting with the STAT3 inhibitor PIAS3. EMBO J. **19**: 5845-55.

Rosenblatt, K.P., Sun, Z.P., Heller, S. und Hudspeth, A.J. (1997). Distribution of Ca2+activated K+ channel isoforms along the tonotopic gradient of the chicken's cochlea. Neuron **19**: 1061-75.

Ruppelt, A. (1997). Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen, welche mit dem Ca2+ abhängigen K+ Kanal (BK) interagieren. Diplomarbeit, Universität Göttingen. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239**: 487-491.

Saito, M., Nelson, C., Salkoff, L. und Lingle, C.J. (1997). A cysteine-rich domain defined by a novel exon in a slo variant in rat adrenal chromaffin cells and PC12 cells. J. Biol. Chem. **272**: 11710-7.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd Edition.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chainterminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.

Schopperle, W.M., Holmqvist, M.H., Zhou, Y., Wang, J., Wang, Z., Griffith, L.C., Keselman, I., Kusinitz, F., Dagan, D., und Levitan, I.B. (1998). Slob, a novel protein that interacts with the slowpoke calcium-dependent potassium channel. Neuron **20**: 565-73.

Schreiber, M. und Salkoff, l. (1997). A novel calcium-sensing domain in the BK channel. Biophys. J. **73**: 1355-63.

Schreiber, M., Yuan, A. und Salkoff, L. (1999). Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. Nat. Neurosci. **2**: 416-21.

Schwartz, M.L. und Schlaepfer, W.W. (1996). Neuronal Promoter Analysis by in Vitro Transcription Using Nuclear Extracts from Rat Brain. Methods **10**: 320-7.

Sheng, M. und Wyszynski, M. (1997). Ion channel targeting in neurons. Bioessays 19: 847-53.

Smart, T.G. (1987). Single calcium-activated potassium channels recorded from cultured rat sympathetic neurones. J. Physiol. **389**: 337-360.

Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. Gene **67**: 31-40.

Soh, H., Jung, W., Uhm, D.Y. und Chung, S. (2001). Modulation of large conductance calcium-activated potassium channels from rat hippocampal neurons by glutathione. Neurosci. Lett. **298**: 115-8.

Spreafico, F., Barski, J.J., Farina, C. und Meyer, M. (2001). Mouse DREAM/calsenilin/ KChIP3: gene structure, coding potential, and expression. Mol. Cell. Neurosci. **17**:1-16.

Stocker, M., Hellwig, M. und Kerschensteiner, D. (1999). Subunit assembly and domain analysis of electrically silent K+ channel alpha-subunits of the rat Kv9 subfamily. J. Neurochem. **72**: 1725-34.

Stocker, M. und Pedarzani, P. (2000). Differential Distribution of Three Ca^{2+} -Activated K⁺ Channel Subunits, SK1, SK2, SK3, in the Adult Rat Central Nervous System. Mol. Cell. Neurosci. **15**: 476-93.

Storm, J.F. (1987). Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. J. Physiol. **385**: 733-59.

Takimoto, K., Yang, E.K. und Conforti, L. (2002). Palmitoylation of KChIP splicing variants is required for efficient cell surface expression of Kv4.3 channels. J. Biol. Chem. **277**: 26904-11.

Toro, L., Wallner, M., Meera, P. und Tanaka, Y. (1998). Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily. News Physiol. Sci. **13**: 112-7.

Tseng-Crank, J., Foster, C.D., Krause, J.D., Mertz, R., Godinot, N., DiChiara, T.J. und Reinhart, P.H. (1994). Cloning, expression, and Distribution of Functionally Distinct Ca²⁺-Activated K⁺ Channel Isoforms from Human Brain. Neuron **13**: 1315-30.

Uebele, V.N., Lagrutta, A., Wade, T., Figueroa, D.J., Liu, Y., McKenna, E., Austin, C.P., Bennett, P.B. und Swanson, R. (2000). Cloning and functional expression of two families of beta-subunits of the large conductance calcium-activated K+ channel. J. Biol. Chem. **275**: 23211-8.

Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N.V. und Adelman, J.P. (1998). Calcium-activated potassium channels. Curr. Opin. Neurobiol. 8: 321-9.

Vernon, E., Meyer, G., Pickard, L., Dev, K., Molnar, E., Collingridge, G.L. und Henley, J.M. (2001). GABA(B) receptors couple directly to the transcription factor ATF4. Mol. Cell. Neurosci. **17**: 637-45.

Vogalis, F., Vincent, T., Qureshi, I., Schmalz, F., Ward, M.W., Sanders, K.M. und Horowitz, B.(1996). Cloning and expression of the large-conductance Ca(2+)-activated K+ channel from colonic smooth muscle. Am J Physiol **271**: G629-39.

Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M. und Cooper, J.A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. Cell **74**: 205-14.

Wallner, M., Meera, P., Ottolia, M., Kaczorowski, G.J., Latorre, R., Garcia, M.L., Stefani, E. und Toro, L. (1995). Characterization of and modulation by a beta-subunit of a human maxi KCa channel cloned from myometrium. Receptors Channels **3**: 185-99.

Wallner, M., Meera, P. und Toro, L. (1996). Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca(2+)-sensitive K+ channels: an additional transmembrane region at the N terminus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 14922-7.

Wallner, M., Meera P. und Toro L. (1999a). Potassium Ion Channels: Molecular Structure, Function, and Diseases. In: Current Topics in Membranes, Volume 46, Editor: Y. Kurachi; L.Y. Jan, M. Lazdunski, Academic Press, 117-40.

Wallner, M., Meera, P. und Toro, L. (1999b). Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca2+-activated K+ channels: a transmembrane beta-subunit homolog. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 4137-42.

Wang, J., Zhou, Y., Wen, H. und Levitan, I.B. (1999). Simultaneous binding of two protein kinases to a calcium-dependent potassium channel. J. Neurosci. **19**: RC4.

Weiger, T.M., Holmqvist, M.H., Levitan, I.B., Clark, F.T., Sprague, S., Huang, W.J., Ge, P., Wang, C., Lawson, D., Jurman, M.E., Glucksmann, M.A., Silos-Santiago, I., DiStefano, P.S. und Curtis, R. (2000). A novel nervous system beta subunit that

downregulates human large conductance calcium-dependent potassium channels. J. Neurosci. **20**: 3563-70.

White, J.H., McIllhinney, R.A., Wise, A., Ciruela, F., Chan, W.Y., Emson, P.C., Billinton, A. und Marshall, F.H. (2000). The GABA(B) receptor interacts directly with the related transcription factors CREB2 and ATFx. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 13967-72.

Wible, B.A., Yang, Q., Kuryshev, Y.A., Accili, E.A. und Brown, A.M. (1998). Cloning and expression of a novel K+ channel regulatory protein, KChAP. J. Biol. Chem. **273**: 11745-51.

Wisden, W. und Morris, B.J. (1994). In Situ Hybridization Protocols for the Brain. Academic Press London.

Wu, H., Reissner, C., Kuhlendahl, S., Coblentz, B., Reuver, S., Kindler, S., Gundelfinger, E.D. und Garner, C.C. (2000). Intramolecular interactions regulate SAP97 binding to GKAP. EMBO J. **19**: 5740-51.

Wu, W.L., So, S.C., Sun, Y.P., Zhou, T.S., Yu, Y., Chung, Y.W., Wang, X.F., Bao, Y.D., Yan, Y.C. und Chan, H.C. (1998). Functional expression of a Ca2+-activated K+ channel in Xenopus oocytes injected with RNAs from the rat testis. Biochim. Biophys. Acta **1373**: 360-5.

Wyszynski, M. und Sheng, M. (1999). Analysis of ion channel associated proteins. Methods Enzymol. **294**: 371-85.

Xia, X.M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J.E., Ishii, T., Hirschberg, B., Bond, C.T., Lutsenko, S., Maylie, J. und Adelman, J.P. (1998a). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. Nature **395**: 503-7.

Xia, X.M., Hirschberg, B., Smolik, S., Forte, M., und Adelman, J.P. (1998b). Dslo interacting protein 1, a novel protein that interacts with large-conductance calcium-activated potassium channels. J. Neurosci. **18**: 2360-9.

Xia, X.M., Ding, J.P. und Lingle, C.J. (1999). Molecular basis for the inactivation of Ca2+- and voltage-dependent BK channels in adrenal chromaffin cells and rat insulinoma tumor cells. J. Neurosci. **19**: 5255-64.

Xu, J., Yu, W., Jan, Y.N., Jan, L.Y. und Li, M. (1995). Assembly of voltage-gated potassium channels. Conserved hydrophilic motifs determine subfamily-specific interactions between the alpha-subunits. J. Biol. Chem. **270**: 24761-8.

Yao, I., Iida, J., Nishimura, W., Hata, Y. (2002). Synaptic and nuclear localization of brain-enriched guanylate kinase-associated protein. J. Neurosci. **22**: 5354-64.

Zhou, X.B., Arntz, C., Kamm, S., Motejlek, K., Sausbier, U., Wang, G.X., Ruth, P. und Korth, M. (2001). A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase. J. Biol. Chem. **276**: 43239-45.

Zhou, Y., Schopperle, W.M., Murrey, H., Jaramillo, A., Dagan, D., Griffith, L.C. und Levitan, I.B. (1999). A dynamically regulated 14-3-3, Slob, and Slowpoke potassium channel complex in Drosophila presynaptic nerve terminals. Neuron **22**: 809-18.

Zhou, Y., Wang, J., Wen, H., Kucherovsky, O. und Levitan, I.B. (2002). Modulation of Drosophila slowpoke calcium-dependent potassium channel activity by bound protein kinase A catalytic subunit. J. Neurosci. **22**: 3855-63.

II Anhang

II.I Oligonukleotide

Nr.	Sequenz $(5' \rightarrow 3')$	Ziel- sequenz	Verwen- dung
233	GGCAGCAAACGGTCCACAGGTACTTGAGAG TCCGCCAGAGCAAGATGATG	BK	ISH
234	CATCATCTTGCTCTGGCGGACTCTCAAGTAC CTGTGGACCGTTTGCTGCC	BK-Kontr.	ISH
402	GTGTCTGCGGAGTGCTGT	BK	RT-PCR
403	TCCTTCCCTACTGTTTGTGA	BK	RT-PCR
439	GGGGATCCTCAAAGCCGCTCTTCCTGAAC	BK	PCR
443	CGGAATTCAATGCACTTCGAGGGGGGTTACA	BK	PCR
459	GCAGAGCTTCACCATTGAA	BKAP-A1	PCR
507	GTTTACCGATGCCCTTGG	pVP16	Seq.
1433	GGCAAAGGCAAGAGTAACAGC	ВКАР	RT-PCR
1434	CAGGAAGGGCAGGAGCAAC	ВКАР	RT-PCR
1438	CCGGAATTCGTGCCACCAGGGTTCTTTCAG	BKAP-A1	PCR
1439	CCGGAATTCCCACTGAATGCTTTAGGT	BKAP-A1	PCR
1440	CCGGAATTCCCTGGGCCTAACAGACCT	BKAP-A1	PCR
1441	GCCGGATCCTTAGGCTTTTGCTTCGCTCG	BKAP-A1	PCR
1442	CGCGGATCCTTACATTGCACCTCCATAGTT	BKAP-A1	PCR
1443	CGCGGATCCTTAGTCTCCCGAATTGGTTGA	BKAP-A1	PCR
1455	CGGGGATCCTGAGGGGACGCGGTAATG	BKAP-A1	PCR
1496	TAGAAGGCACAGTCGAGG	pcDNA3/ Myc-His	Seq.
1501	CCGGAATTCCCCTACGAGTTTGAAC	BK	PCR
1502	CGCGGATCCTTAGGGATTGGTGATGACGTA	BK	PCR
1503	CGCGAATTCTGTTATGGTGATCTGTTCTG	BK	PCR
1504	CGCGGATCCTTAACTGGACGACTGTGAGG	BK	PCR
1566	GGCCGGATCCGGCAAAGGCAAGAGTAA	BKAP-A1 BKAP-B1	PCR
1567	ACGCGTCGACTCACACACTCATGGTCAT	BKAP-A1	PCR

1568	ACGCGTCGACTCACGGCTGGTTACTCAAGC TC	BKAP-B1	PCR
1842	GCTGACTCACGATGGTTTTCATGAGGGGAC GCGGTAATGGATCAC	ВКАР	ISH
1843	GTGATCCATTACCGCGTCCCCTCATGAAAA CCATCGTGAGTCAGC	BKAP- Kontr.	ISH
1844	AGTTCCCAGGAGACGCCGAGGAGTAGGGT ATTGAATTGGCATTTG	ВКАР	ISH
1845	TATTCATACACGTAGAGCGCTAACTTCTCCC GGGCCTGGCTGTCG	ВКАР	ISH
1847	GGCGAATTCCACCATGTACGGCAAAGGCAA GAGTAACAGC	BKAP-A1	PCR
1848	CTAGTCTAGACACACTCATGGTCATGCTGG GC	BKAP-A1	PCR
1854	GGCGGATCCACCATGTACGGCAAAGGCAA GAGTAACAGC	BKAP-A1	PCR
1873	TCGAGATGCATTCTAGATACCCTTACGACG TGCCCGACTACGCCTGAGGGCC		pcDNA3- HA
1874	CTCAGGCGTAGTCGGGGCACGTCGTAAGGGT ATCTAGAATGCATC		pcDNA3- HA
1973	CGCGGATCCACCATGAAGAAATACGGGGG CTC	BK	PCR
1974	CGCGGATCCACCATGCCCAAAAGAATTAAA A	BK	PCR
1975	CGCGGATCCACCATGGGCTGCAGGCGGCTT GA	ВК	PCR
1976	CGCGGATCCACCATGCCGAAGCTGATGAGG CA	ВК	PCR
1978	CCGTCTAGAAAGCCGCTCTTCCTGAAC	BK	PCR
1987	CTAGTCTAGATCACACACTCATGGTCATG	BKAP-A1	PCR

BK-	Aminosäuren	Länge	Schema
Konstrukt	(von-bis)*	(As)	
BK10E	395 - 1205	811	Abb. 26
BK-K2	687 - 1205	519	Abb. 26
BK-K1	694 - 1205	512	Abb. 26
BK11A	725 - 1205	481	Abb. 12 u. 26
BK316	395 - 710	316	Abb. 12
BK6B	1049 - 1205	157	Abb. 12
BK6B-1	1130 - 1205	76	Abb. 14
BK6B-2	1049 - 1129	81	Abb. 14
BK6B-3	1087 - 1169	83	Abb. 14

II.II Übersicht der verwendeten Konstrukte

*) α -rSlo: alternatives Exon nur in Spleißstelle D; α -Ende (C-terminale Sequenz KYVQEERL; Hülsemann, 1998)

BKAP- Konstrukt	Aminosäuren (von-bis)*	Länge (As)	Schema
BKAP-A	1 - 361	361	Abb. 1
BKAP-A1	3 - 361	359	Abb. 1 u. 6
BKAP-A2	3 - 266	264	Abb. 6
BKAP-A3	3 - 196	194	Abb. 6
BKAP-A4	3 - 90	88	Abb. 6
BKAP-A5	118 - 361	244	Abb. 6
BKAP-A6	199 - 361	163	Abb. 6
BKAP-A7	277 - 361	85	Abb. 6
BKAP-B1	3 - 331	299	Abb. 1 u. 6

*) bezogen auf BKAP-A

II.III Der Vektor pcDNA3-HA

In die *XhoI*- und *ApaI*-Schnittstellen des Expressionsvektors pcDNA3 wurden die Oligonukleotide 1873 und 1874 eingefügt (vgl. 2.2.1.1.5), die eine *XbaI*-Schnittstelle enthalten und für ein HA-Epitop (Aminosäuresequenz grau unterlegt) kodieren.

	Hind III	Kpn I	Bam H I			EcoR I	EcoR V	Not I
889	AAGCTTGG	TACCGAGCT	CGGATCCCTA	GTAACGGCCGC	CAGTGTGCTG	GAATTCTGCA	GATATCCATCA	CACTGGCGGCC
	TTCGAACC	ATGGCTCGAG	GCCTAGGGAT	CATTGCCGGCG	GTCACACGAC	CTTAAGACGI	TCTATAGGTAGT	GTGACCGCCGG
	K L G	TEL	G S L	VTAA	S V L	EFC	RYPS	H W R P
	Xho I	Xba	I			Apa	I	
	GCTCGAGA	TGCATTCTAC	SATACCCTTA	CGACGTGCCCG	ACTACGCCTG	AGGGCCCTAT	ΓΤĊΤΑΤΑ	
	GCTCGAGA CGAGCTCT	TGCATTCTAC +++++++++ ACGTAAGATC	GATACCCTTA 	CGACGTGCCCG 	ACTACGCCTG/ +++++++++ TGATGCGGAC	AGGGCCCTAT +++++++++ TCCCGGGAT/	ΓΤĊΤΑΤΑ > \AGATAT	

II.IV Klonierungen

DNA- Fragment	Herkunft (PCR: Primer <i>s/as</i>)	In Vektor	Schnittstellen
BK10E	1973/1978	pcDNA3-HA	BamHI/XbaI
BK-K2	1974/1978	pcDNA3-HA	BamHI/XbaI
BK-K1	1975/1978	pcDNA3-HA	BamHI/XbaI
BK11A	1976/1978	pcDNA3-HA	BamHI/XbaI
	pLexN-BK11A*	pGEX-4T-1	EcoRI/SalI
BK316	pLexN-BK316*	pGEX-4T-1	EcoRI/SalI
BK6B	pLexN-BK6B*	pVP16	EcoRI/BamHI (Frag.);
			EcoRI/BglII (Vektor)
	pLexN-BK6B**	pSP64	EcoRI/BamHI
	pSP64-BK6B**	pRSET-A	EcoRI/HindIII
	pSP64-BK6B**	pGEX-4T-1	EcoRI/SalI
	pLexN-BK6B	pET32a	EcoRI/SalI
BK6B-1	1501/439	pLexN	EcoRI/BamHI
	pLexN-BK6B-1	pGEX-4T1	EcoRI/SalI
	pLexN-BK6B-1	pET32a	EcoRI/SalI
BK6B-2	443/1502	pLexN	EcoRI/BamHI
	pLexN-BK6B-2	pGEX-4T1	EcoRI/SalI
	pLexN-BK6B-2	pET32a	EcoRI/SalI

BK6B-3	1503/1504	nI evN	FcoRI/BamHI
DR0D-3	n ov N PK6P 2	pLexit pGEV 4T1	EcoRI/Dallin
	plexin-drod-3	рОЕЛ-411 "БТ22-	ECONI/Sall
	pLexN-BK6B-3	pE132a	EcoRI/Sall
BKAP-A	1847/1848	pcDNA3-Myc/His	⁸)
	1854/1987	pcDNA3-Myc/His	BamHI/XbaI
BKAP-A1	pVP16-BKAP-A1***	pLexN	BamHI/BglII (Frag.);
			BamHI (Vektor)
	pVP16-BKAP-A1	pGAD424	BamHI/BglII
	1566/1567	$pBKS^+$	BamHI/BglII
	pBKS ⁺ BKAP-A1	pGEX-4T-1	BamHI/SalI
	pBKS ⁺ BKAP-A1	pET32a	BamHI/SalI
	pET32-BKAP-A1	pRSET-A	BamHI/HindIII
BKAP-A2	459/1443	pVP16	EcoRI/BamHI (Frag.);
			EcoRI/BglII (Vektor)
	459/1443	pLexN	EcoRI/BamHI
BKAP-A3	459/1442	pVP16	EcoRI/BamHI (Frag.);
			EcoRI/BglII (Vektor)
	459/1442	pLexN	EcoRI/BamHI
BKAP-A4	459/1441	pVP16	EcoRI/BamHI(Frag.);
			EcoRI/BglII (Vektor)
	459/1441	pLexN	EcoRI/BamHI
BKAP-A5	1438/1455	pVP16	^{§§})
BKAP-A6	1439/1455	pVP16	§§)
BKAP-A7	1440/1455	pVP16	^{§§})
BKAP-B1	pVP16-BKAP-B1***	pLexN	BamHI/BglII (Frag.);
			BamHI (Vektor)
	pVP16-BKAP-B1	pGAD424	BamHI/BglII
	1566/1568	$pBKS^+$	BamHI/SalI
	pBKS ⁺ -BKAP-B1	pGEX-4T-1	BamHI/SalI
	pBKS ⁺ -BKAP-B1	pET32a	BamHI/SalI
	pET32-BKAP-B1	pRSET-A	BamHI/HindIII
		pcDNA3-Myc/His	

*) Ruppelt, 1997

**) D.Kerschensteiner und M.Stocker, unpubliziert

***) Okamoto und Südhof, 1997

[§]) Klonierung von BKAP-A in zwei Schritten in pcDNA3.1/Myc-His, zur Expression des Proteins mit Myc-Epitop:



^{§§}) Klonierung der Konstrukte BKAP-A5, -A6 und A7 in zwei Schritten in pVP16:



II.V Konzentrationen der Erstantikörper

Antikörper gegen:	Verwendung	Verdünnung	Endkonzen- tration
Τ7	Western	1:10000	0,1 µg/ml
GST	Western	1:1000	0,2 µg/ml
Trx	Western	1:2000 - 1:2500	0,4 -0,5 µg/ml
Мус	Western	1:250	1,6 µg/ml
	IF	1:400 - 1:500	0,8 - 1 µg/ml
NeuN	IF (Abb. 25)	1:200	0,5 µg/ml
MAP2	IF (Abb. 25)	1:300	nicht bekannt
BK	Western	1:450 - 1:600	0,5 -0,7 μg/ml
(Chemicon)	IF	1:500	0,6 µg/ml

Antikörper gegen:	Verwendung	Verdünnung	Endkonzen- tration	Siehe Kap.:
BK6B-1 (Serum)	Western (Abb. 20)	1:3000	nicht bekannt	2.2.3.6
BK6B-1 (GST-gereinigt)	Western	1:3000* (Abb. 20) 1:2000* (Abb. 21)	nicht bekannt	2.2.3.7.1
BKAP-B1 (Serum)	Western (Abb. 23A)	1:2500	nicht bekannt	2.2.3.6
BKAP-B1 (gereinigt)	<i>Western</i> IF	1:600* 1:500* (Abb. 22B) 1:250* (Abb. 25)	nicht bekannt	2.2.3.7.2

*) bezogen auf das bei der Reinigung eingesetzte Antiserum

Danksagung

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung "Molekulare Biologie neuronaler Signale" danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Walter Stühmer für seine stete Förderung und Unterstützung während der Anfertigung meiner Dissertation.

Prof. Dr. Michael Hollmann danke ich für seine Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit an der Ruhr-Universität Bochum zu übernehmen, für sein Interesse an dieser Arbeit und für die freundliche Unterstützung bei den EMBO- und DAAD-Anträgen sowie bei der Korrektur des Manuskripts.

Dr. Martin Stocker danke ich für das interessante Thema, die fundierte Ausbildung in der Molekularbiologie, die Anleitung und tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, die kritische Durchsicht des Manuskriptes und für die lehrreiche Zeit.

Dr. Paola Pedarzani gebührt Dank für die Einarbeitung in die Fluoreszenzmikroskopie und die lehrreichen Literaturseminare.

Dr. Florentina Soto und Daniel Kerschensteiner möchte ich für die interessanten Diskussionen und für ihre Hilfsbereitschaft herzlich danken.

Dr. Marco Gymnopoulos hat nicht nur die *in situ*-Hybridisierungen zu dieser Arbeit beigesteuert, sondern auch das Manuskript durchgesehen und zahlreiche wertvolle Hinweise zu Computerfragen gegeben, wofür ich ihm besonders dankbar bin.

Lorenzo Cingolani danke ich für die Proteinproben der P20-Membranpräparation und für die hilfreichen Tips zur Membranpräparation und zur Affinitätsreinigung.

Von den "Londonern" danke ich besonders Dr. Klaus Hirzel und Dieter D'Hoedt für die interessanten Diskussionen und für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Barbara Scheufler bin ich für ihre Unterstützung bei der neuronalen Zellkultur und für die Einarbeitung in die Methode sehr dankbar.

Dem technischen Personal der Abteilung, insbesondere Kerstin Borchardt, Jörg Schischkoff und Barbara Scheufler, danke ich für die Bereitstellung der technischen Ausstattung.

Meinen Eltern und Anke Hartmann gilt mein besonderer Dank für ihre Unterstützung und den Rückhalt, nicht nur während der Anfertigung meiner Dissertation.