



Klaus Hentrich (Autor)

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

Klaus Hentrich

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



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3280>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

I	Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Molekulare Diversität der Kaliumkanäle	1
1.2	Der BK-Kanal	3
1.3	Physiologische Funktionen des BK-Kanals	4
1.4	Potentielle Interaktionspartner des BK-Kanals von Säugetieren	5
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit	6
2	Material und Methoden	7
2.1	Material	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	<i>E.coli</i>	11
2.1.6.2	<i>S.cerevisiae</i>	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 (<i>Rattus norvegicus</i>).....	14

2.2	Methoden	15
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
2.2.1.2.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> DH5 α	17
2.2.1.2.2	Ligation	18
2.2.1.2.3	Transformation von <i>E. coli</i>	18
2.2.1.2.4	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	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 (<i>Northern Blot</i>).....	24
2.2.2.3.1	Radioaktive Markierung von DNA	24
2.2.2.3.2	Hybridisierung	24
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 (<i>Western Blot</i>).....	26
2.2.3.4	Expression von rekombinanten Proteinen in Bakterien.....	27
2.2.3.4.1	Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektroporation	28
2.2.3.4.2	Elektroporation.....	28
2.2.3.4.3	Anzucht von Bakterienkulturen für die Proteingewinnung.....	28
2.2.3.5	Reinigung der rekombinanten Proteine	29
2.2.3.5.1	GST-Fusionsproteine	29
2.2.3.5.2	Proteine mit Hexahistidin- <i>Tag</i>	30

2.2.3.6	Gewinnung polyklonaler Antikörper.....	31
2.2.3.7	Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper.....	31
2.2.3.7.1	Entfernen von GST-Antikörpern.....	31
2.2.3.7.2	Reinigung an immobilisiertem Antigen.....	31
2.2.4	Untersuchung von Proteininteraktionen.....	32
2.2.4.1	Wechselwirkung mit membrangebundenen Proteinen (<i>Filter Overlay</i>).....	32
2.2.4.2	Kosedimentation mit GST-Fusionsproteinen (<i>GST-Pulldown</i>).....	33
2.2.4.2.1	Kosedimentation von in <i>E.coli</i> exprimierten Proteinen.....	33
2.2.4.2.2	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
2.2.4.4.1	Das verwendete Hefesystem.....	34
2.2.4.4.2	Transformation von Hefe.....	35
2.2.4.4.3	Präparation von Lachssperma-DNA für die Transformation.....	36
2.2.4.4.4	β -Galaktosidasetest.....	36
2.2.5	Experimente mit Säugetierzelllinien in Kultur.....	36
2.2.5.1	Zellkultur.....	37
2.2.5.2	Transiente Transfektion.....	37
2.2.5.3	Lysate für <i>Western</i> - und Interaktionsstudien.....	37
2.2.5.4	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	38
2.2.5.5	Immunfluoreszenz.....	38
2.2.5.5.1	Beschichten von Deckgläsern.....	38
2.2.5.5.2	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 Hippocampus-Neuronen.....	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Klonierung und Sequenzanalyse des BK-assoziierten Proteins, BKAP ..	41
3.1.1	Identifizierung von BKAP als potentieller Interaktionspartner von BK.....	41
3.1.2	BKAP kommt in mehreren Spleißvarianten im Gehirn der Ratte vor.....	45
3.1.3	BKAP ist zu einem Einzelstrang-DNA bindenden Protein homolog.....	46
3.2	Interaktionsstudien mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System	47
3.2.1	Interaktion von BKAP mit BK im Zwei-Hybrid-System.....	47
3.2.2	Verkürzen von BKAP verhindert die Interaktion mit BK.....	49

3.3	Untersuchungen zur Expression von BKAP in Ratten	51
3.3.1	<i>Northern</i> -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	Biochemische Studien zur Interaktion von BKAP und BK mit rekombinanten Proteinen	56
3.4.1	Versuch des Nachweises der Interaktion zwischen BKAP und BK mit <i>Filter Overlay</i> -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	Expression und Lokalisierung von BKAP in Säugetierzelllinien	63
3.5.1	<i>Western</i> -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	Versuch der Kosedimentation des vollständigen, in Säugetierzellen exprimierten BK-Kanals mit BKAP	68
3.6.1	Bedingungen für die Detektion des BK-Kanals im <i>Western Blot</i>	68
3.6.2	Reinigung eines BK-Antiserums	69
3.6.3	Der vollständige BK-Kanal kosedimentierte nicht mit GST-BKAP	72
3.7	Charakterisierung und subzelluläre Lokalisierung des nativen BKAP-Proteins	74
3.7.1	Reinigung und Charakterisierung eines polyklonalen BKAP-Antikörpers	74
3.7.2	Der BKAP-Antikörper erkennt eine spezifische Bande im <i>Western Blot</i> aus dem Gehirn der Ratte.....	75
3.7.3	Der BK-Kanal, nicht aber BKAP, ist in der Membranfraktion aus Rattenhirn detektierbar	77
3.7.4	Der BKAP-Antikörper markiert den Kern von Hippocampus-Neuronen.....	79

3.8	Untersuchungen zum Kerntransport eines BK-Fragments	81
3.8.1	Der intrazelluläre C-Terminus des BK-Kanals enthält ein funktionelles Kerntransportsignal	82
3.8.2	Koexpression von BKAP führt zur Akkumulation des BK-C-Terminus im Kern von Säugetierzellen.....	87
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 Funktion im Zellkern?	101
5	Zusammenfassung	104
6	Literaturverzeichnis.....	105
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